Pflanzliche Protoplasten im elektrischen Feld

Elektrofusion und damit verbundene Fragestellungen

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WERNER MEHRLE
aus Stuttgart

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0040

Pflanzliche Protoplasten im elektrischen Feld

Elektrofusion und damit verbundene Fragestellungen

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WERNER MEHRLE
aus Stuttgart

1986

Tag der mündlichen Prüfung	28.10.1986
Dekan	Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter	Prof. Dr. R. Hampp
2. Berichterstatter	Prof. Dr. U. Zimmermann

---

gedruckt 1986 bei H.-J. Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

Ein Bild sagt mehr als tausend Worte

Chinesische Weisheit

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Hampp für die Betreuung der Arbeit, sein stetes Interesse und die ständige Hilfsbereitschaft. Durch zahlreiche Anregungen und Diskussionen hat er sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. U. Zimmermann von der Universität Würzburg für die großzügige finanzielle Unterstützung sowie für sein Interesse und seinen fachlichen Rat bei der Lösung von Problemen.

Allen Laborkollegen unserer Abteilung sei gedankt für die gute Arbeitsatmosphäre und die Kooperationsbereitschaft (z.B. "Protoplastenisolierung").

Außerdem bedanke ich mich bei allen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und hier nicht namentlich genannt sind.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert (Projekt-Nr.: 0373509 und 01QV8520).

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Problemstellung	6
1.2.	Abkürzungen	7
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1.	Pflanzenmaterial und Anzucht	8
2.2.	Isolierung von Mesophyllprotoplasten	8
2.2.1.	Avena sativa	10
2.2.2.	Nicotiana tabacum	10
2.2.3.	Vicia faba	11
2.2.4.	Verwendete Medien	11
2.3.	Reinigung der Protoplasten	12
2.4.	Herstellung vakuolenfreier Mesophyll-Protoplasten	13
2.5.	Bestimmung von Bezugsgrößen	
2.5.1.	Zellzahl	15
2.5.2.	Längenmessung	15
2.5.3.	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	15
2.6.	Fluoreszenzmikroskopie	
2.6.1.	Grundlagen	16
2.6.2.	Farbstoffe	16
2.6.3.	Fluoreszenz-Mikrophotographie	17
2.6.4.	Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Markierung von Zellen	20
2.7.	Vitalitätsbestimmung von Protoplasten	21
2.7.1.	Optische Merkmale	21
2.7.2.	Vitalfärbungen	22
2.7.3.	Vitalfluorochromierung	22
2.7.4.	Stoffwechselphysiologische Untersuchungen	
2.7.4.1.	Zellwandsynthese und Teilung	23
2.7.4.2.	Zellelektrophorese	23
2.7.4.3.	Glycolatoxidase Test	23
2.7.4.4.	Polarographische Sauerstoffbestimmung	24
2.7.5.	Nachweis der photosynthetischen Sauerstoffproduktion einzelner Protoplasten durch die Chemotaxis von Bakterien	

2.7.5.1. Historisches 25
2.7.5.2. Pseudomonas aeruginosa 25
2.7.5.3. Kultur von Pseudomonas aeruginosa 26
2.7.5.4. Versuchsdurchführung 27
2.8. Elektrisch induzierte Fusion
2.8.1. Theorie 28
2.8.1.1. Dielektrophorese 28
2.8.1.2. Elektrischer Durchbruch 31
2.8.1.3. Fusion und Abrundung 32
2.8.2. Experimenteller Aufbau 32
2.8.3. Fusionskammern 34
2.8.4. Darstellung von Mikrofeldern 36
2.8.5. Elektropermeabilisierung 37
2.9. Geräte und Chemikalien 38

3. ERGEBNISSE
3.1. Protoplastenisolierung
3.1.1. Mesophyllprotoplasten 40
3.1.1.1. Avena sativa 42
3.1.1.2. Nicotiana tabacum 43
3.1.1.3. Vicia faba 44
3.1.2. Evakuolisierung der Mesophyllprotoplasten 45
3.1.2.1. Evakuolisierte Protoplasten 46
3.1.3. Vakuolen und Pseudovakuolen 48
3.2. Protoplasten im elektrischen Wechselfeld
3.2.1. Dielektrophoretische Kraft 50
3.2.2. Frequenzabhängigkeit 53
3.2.3. Darstellung von Mikrofeldern 54
3.2.4. Diskussion 60
3.3. Elektrischer Durchbruch 63
3.3.1. Besimmung der Membranfusionsspannung 64
3.3.2. Fusion von Protoplasten 68
3.3.3. Diskussion 69
3.4. Elektropermeabilisierung 72
3.4.1. Diskussion 76
3.5. Erarbeitung von Methoden zur Vitalitäts-
bestimmung einzelner Protoplasten 81

3.5.1. Nachweis der photosynthetischen O_2-Produktion einzelner Protoplasten durch die Chemotaxis von Bakterien 81
3.5.1.1. Optimierung der Versuchsbedingungen 82
3.5.1.2. Unterscheidung zwischen Chemotaxis und Aerotaxis 84
3.5.2. Vergleich verschiedener Vitalitätstests mit dem Pseudomonas-Versuch 89
3.5.3. Diskussion 93
3.6. Erarbeitung einer Methode zur semiquantitativen Bestimmung der O_2-Produktion einzelner Protoplasten
3.6.1. Optimierung der Versuchsbedingungen 94
3.6.2. Messungen an Mesophyllprotoplasten 95
3.6.3. Vergleichsmessungen mit der Sauerstoffelektrode 98
3.6.4. Messungen an evakuolisierten Protoplasten 102
3.6.5. Messungen an Hybridprotoplasten 105
3.6.6. Diskussion 111

4. ALLGEMEINE DISKUSSION 114

5. ZUSAMMENFASSUNG 119

6. LITERATURVERZEICHNIS 121

1. EINLEITUNG

Pflanzliche Protoplasten bilden seit der von Cocking (1960) eingeführten Methode des enzymatischen Abbaus der Zellwand ein wichtiges Hilfsmittel zur Erforschung grundlegender Stoffwechselprozesse und sind ein nicht mehr wegzudenkendes Objekt der Pflanzenzüchter.

Immer häufiger werden Protoplasten auch als Untersuchungsmaterial für elektrophysiologische und biophysikalische Studien eingesetzt. So zur Untersuchung von Plasmalemmaeigenschaften wie hydraulische Leitfähigkeit (Salhani et al. 1982) Membranpotential (Racusen et al. 1977, Rubinstein 1978, Nagata und Melchers 1978), Widerstands- und Kapazitätsmessungen (Arnold und Zimmermann 1982) und dielektrischen Eigenschaften (Stoicheva et al. 1985). Viele dieser physikalischen Zellparameter können aus dem Verhalten der Protoplasten in elektrischen Gleich- und Wechselstromfeldern gewonnen werden. Als wichtigste Methoden sind vor allem Zellelektrophorese, Dielektrophorese, Rotation, Orientierung und Ladungspulsexperimente zu nennen.

Die Vorteile, die Protoplasten gegenüber tierischen Zellen bei solchen Versuchen haben, sind ihre Größe und Struktur, die sie gut im Mikroskop sichtbar machen, ihre einfache sphärische Form für physikalische Berechnungen und die gute Haltbarkeit auch in nichtionischen Lösungen.
Trotzdem sind Protoplasten "in vitro" Zellen; in wie weit Ergebnisse auf Zellen oder gar auf die natürliche Situation der Pflanze übertragbar sind, muß in jedem Einzelfall überprüft werden.

Isolierte Protoplasten lassen sich leicht miteinander verschmelzen. Bei den klassischen Fusionsmethoden kompensieren chemische Substanzen oder Viren die negative Oberflächenladung der Protoplasten, fördern somit die Aggregation und können durch Störung der Membranstruktur ihre Fusion einleiten.

Eine elegante Methode stellt die von Zimmermann und Scheurich 1981 entwickelte elektrische Zellfusion dar. Bei dieser Technik wird der enge Membrankontakt zwischen den zu fusionierenden Zellen durch ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld erzielt (Dielektrophorese). Durch Applikation eines kurzen Feldpulses hoher Intensität wird der Fusionsprozeß ausgelöst (elektrischer Durchbruch). Bei dieser sehr kurzen Polarisierungszeit der Membran sind die elektrisch induzierten Struktur- und Permeabilitätsänderungen reversibel und die Membranen heilen unter Bildung von Fusionsprodukten aus.

Die Elektrofusion hat gegenüber den konventionellen Methoden eine Reihe von Vorteilen:

- Der Fusionsprozeß ist in jedem Stadium unter dem Mikroskop beobachtbar und kann gesteuert werden.

- Die beteiligten Zellen sind individuell sichtbar. Das Verhalten der Zellkerne wie aller übrigen Zellbestandteile kann während des ganzen Fusionsprozesses verfolgt werden.

- Die gewünschten Zellkombinationen lassen sich in engem Rahmen vorher festlegen, von der Fusion einer A-B-Kombination bis hin zur Fusion von $10^3 \ldots 10^4$ Einzelzellen zu einer Riesenzelle (Giant).

- Der Fusionsprozeß dauert nur wenige Minuten und bietet Ausbeuten von 50 bis 80 %. Bei sorgfältiger Vorbereitung lassen sich auch Ausbeuten von 100 % erreichen.

- Bedingt durch die physikalische Natur der Methode spielt die Zellart i. a. für die Fusion keine entscheidende Rolle. Mit dieser Methode lassen sich Hefezellen, tierische und pflanzliche Zellen sowie Bakterien verschmelzen.

- Ebenso lassen sich Partikel entsprechender Größe in die Zelle einschleusen (z. B. für Plasmidtransfer und Arzneimitteldepot) oder auch aus dieser herauslösen (z. B. Freisetzen von Chloroplasten).

Der Mechanismus, welcher der elektrischen Fusion zugrunde liegt, beruht auf den physikalischen Eigenschaften der Zellen und besonders der Zellmembranen. Deshalb ist es möglich, aus dem Verhalten der Zellen im elektrischen Feld und den Fusionsparametern Erkenntnisse über diese Zelleigenschaften zu erhalten.

Beide Schritte der Elektrofusion werden hierbei getrennt betrachtet. Der erste Schritt, die dielektrophoretische Sammlung, ist im Prinzip schon lange bekannt und wurde erstmalig von Liebesny (1939) auf lebende Zellen angewendet. Sie wird benutzt, um den Kraftlinienverlauf im elektrischen Feld der Fusionskammer und zwischen den suspendierten Protoplasten sichtbar zu machen. Aus den dielektrophoretischen Bedingungen können Aussagen über Feldstärken, Feldgradienten, Polarisierbarkeit der Teilchen, Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit der Protoplasten gewonnen werden.

Die Fusion von Zellen, ausgelöst durch den elektrischen Durchbruch der Zellmembran, läßt sich als Kriterium für die Membrandurchbruchsspannung heranziehen. Verschiedene Protoplastentypen und Vakuolen wurden daraufhin untersucht.

Die Technik des elektrischen Durchbruchs läßt sich aber auch zur Einschleusung von membranimpermeablen Substanzen nutzen. Dieses Verfahren der Elektropermeabilisierung, (auch Elektroporation genannt), wurde bereits angewandt, um Partikel in Erythrozyten einzuschleusen (Vienken et al. 1978).

Um mit dieser Methode physikalische Problemstellungen anzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit als Indikatoren für die elektrisch induzierte Aufnahme durch die Membran Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Damit wurde die Wirkung des Pulses auf die Membran und den Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung untersucht.

Von besonderer Bedeutung ist die Intaktheit elektrisch manipulierter Zellen beziehungsweise die Regenerationsfähigkeit der so gewonnenen Hybride. Bei der elektrisch induzierten Fusion wird die Kontaktzone der Membranen kurzzeitig verändert. Damit verbunden ist eine Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit und Permeabilität der Membranen. Aus diesem Umstand ergibt sich bei der Elektrofusion pflanzlicher Protoplasten folgendes Problem:

Bei der Applikation des die Fusion auslösenden Feldpulses kann nicht ausgeschlossen werden, daß der damit verbundene Austausch intra- und extrazellulärer Substanzen zu einer Beeinträchtigung der Vitalität führt. Außerdem kann neben der Plasmamembran auch die der Vakuole kurzzeitig durchlässig werden. Dadurch kann es im einfachsten Fall zu einer Ansäuerung, im ungünstigsten Fall zu einer Vergiftung des Cytosols - und damit des lebenswichtigsten Bereichs der Zelle - kommen. Eine Konsequenz wäre ein hoher Anteil letaler Protoplasten.

Als generell problematisch erweist sich die Abtrennung der Hybride von unfusionierten Zellen und Homofusionsprodukten. Die hierzu existierenden Methoden sind entweder sehr zeitaufwendig (Einzelzellfusion, Koop und Schweiger 1985), schädigen die Zellen (Färbemethoden, Galbraith 1984) oder eignen sich nur für bestimmte Mutanten (Lazar 1983).

Eine einfache und universelle Trennungsmethode mit hoher Ausbeute nützt die Dichteunterschiede zwischen den Fusionspartnern aus. Interspezifische Hybride lassen sich so in einem isoosmotischen Dichtegradienten von den Elternzellen abtrennen. Leider sind die Dichteunterschiede der verschiedenen Protoplasten meist sehr gering.

Eine Lösung dieses Problems stellt die Gewinnung vakuolenfreier Protoplasten dar. Durch Ultrazentrifugation läßt sich die Vakuole aus einem Protoplasten entfernen (Gries-

bach und Sink 1983). Da die Vakuole im wesentlichen Wasser enthält und die im Protoplasten verbleibenden Zellorganellen eine Dichte über 1 g/cm³ haben (Falk und Stocking 1976) unterscheiden sich diese Miniprotoplasten in ihrer Dichte wesentlich von der normaler Protoplasten. Somit lassen sich Hybride aus einem normalen und einem vakuolenfreien Protoplasten von den Ausgangszellen abtrennen (Naton 1986). Außerdem wird damit das Risiko des Vakuolendurchbruchs durch den evakuolisierten Fusionspartner auf die Hälfte reduziert.

Die elektrische Fusion von Protoplasten liefert somit einen wertvollen Ansatzpunkt zur Hybridisierung, Selektion und Züchtung von Pflanzen mit intermediären Eigenschaften. Da die Regeneration bis zur ganzen Pflanze sehr viel Zeit und Geduld erfordert und bis heute nur für einige Gattungen gelungen ist (vgl. Übersichtsartikel Thomas et al. 1979, Dale 1983), ist es von besonderer Wichtigkeit, die physiologische Integrität von Protoplasten und Fusionsprodukten zu erkennen. Dies ist ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit.

Die am häufigsten verwendeten Indikatoren sind Vitalfarbstoffe und Vital-Fluorochrome (Zusammenfassung siehe Bornman und Bornman 1983). Dies sind zwar schnelle Nachweismethoden, aber weniger genau als ein Test auf Zellwandbildung und Teilung. Letzterer benötigt jedoch viel Zeit, sterile Bedingungen, ist zudem nur für wenige Arten anwendbar und damit für einen routinemäßigen Gebrauch nicht geeignet.

Verhoek-Köhler et al. (1983) verwendeten als Vitalitätsmarker biochemische Parameter wie den zellulären Adenin-Nucleotid-Gehalt. Ein System mit höherer Komplexität ist die Photosynthese. Hohe Raten photosynthetischer Sauerstoffproduktion sind nur bei physiologisch intakten Zellen möglich. Um die O_2-Produktion einzelner Hybridzellen zu überprüfen, wurde ein Test entwickelt, der empfindlich ge-

nug ist, den O_2-Gaswechsel eines Protoplasten zu messen. Er basiert auf dem Engelmann'schen Versuch (1881), der die Aerotaxis von Bakterien ausnützt. Dieses Experiment wurde auf Protoplasten übertragen und mit Hilfe moderner Techniken wie Mikrophotographie und Photometrie methodisch verfeinert.

1.1. Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es:

- Das Verhalten verschiedener Protoplastentypen in elektrischen Gleich- und Wechselstromfeldern unter dem Aspekt der elektrisch induzierten Zellfusion zu untersuchen und die Anwendung physikalischer Gesetzmäßigkeiten experimentell zu überprüfen.

- Das Anwendungsspektrum der Elektrofusion auf Protoplasten verschiedener Pflanzenarten (Tabak, Hafer, Bohne), aber auch auf unterschiedliche Membrantypen (Plasmalemma, Tonoplast) zu untersuchen.

- Über die Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen in die Protoplasten Aussagen über die Permeabilisierung der Membran in einem elektrischen Feld zu gewinnen.

- Unter dem Gesichtspunkt eines möglichen "Frühtests" zur Erkennung der Lebensfähigkeit von Hybridzellen ein zuverlässiges Kriterium zu finden.

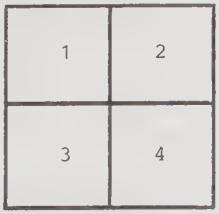
- Unter Verwendung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion als Intaktheitskriterium eine Mikromethode zu erarbeiten, die es erlaubt, die Vitalität einzelner Protoplasten zu bestimmen.

- Die Zuverlässigkeit von Vitalitätstests, insbesondere Färbemethoden, auf ihre physiologische Relevanz zu überprüfen.

1.2 ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosin-diphosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Chl.	Chlorophyll
DAPI	4,6,-Diamidino-2-phenylindol
DBMIB	Dibromothymochinon
DCMU	Dichlorphenyl-dimethylharnstoff
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	1,5-Diphenylcarbazid
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FG	Frischgewicht
G/V	Gewicht pro Volumen
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
NADP(H)	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidierte bzw. reduzierte Form)
OD	optische Dichte
P(+)	normale Mesophyllprotoplasten
P(-)	evakuolisierte Mesophyllprotoplasten
RITC	Rhodaminisothiocyanat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-glycin und N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl)-glycin
V(+)	Pseudovakuolen

Reihenfolge der Abbildungen



2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial und Anzucht

Abb. 1: Hafer, Avena sativa L. (cv. Arnold)

Abb. 2: Tabak, Nicotiana tabacum L. (cv. Samsun)

Abb. 3: Saubohne, Vicia faba L. (cv. Weißkernige Hangdown)

Die Pflanzen wurden in Einheitserde im Gewächshaus bei 20 - 22°C und einer relativen Luftfeuchtkeit von 70 % angezogen. Die Lichtperiode betrug 18 Stunden.
Bei ungünstigen Lichtverhältnissen wurde Zusatzlicht eingesetzt (Osram HWL, 400 W; 65 W/m² auf Höhe der Pflanzen).

2.2. Isolierung von Mesophyllprotoplasten

Da die bei Belichtung im Blatt akkumulierte Stärke zu einer Verminderung der Ausbeute an intakten Protoplasten führt, wurden die zur Isolierung eingesetzten Pflanzen vorher dunkel gestellt.

Protoplasten wurden aus den Blättern durch mechanische Beschädigung oder Entfernung der Epidermis und anschließendem enzymatischen Abbau mittels Cellulasen gewonnen (vgl. Otsuki und Takabe 1969, Power und Cocking 1970, Evans et. al. 1972, Okyama und Nitsch 1972).

Die freigesetzten Protoplasten wurden über einen diskontinuierlichen zweiphasigen Dichtegradienten gereinigt.

Abb. 4: Arbeitsplatz. Fusionsgenerator, Oszilloskop, Fluoreszenzmikroskop mit Photoaufsatz.

2.2.1. Avena sativa

(nach: Hampp und Ziegler, 1980, verändert)

7 bis 8 Tage alte Haferkeimlinge wurden vor Versuchsbeginn ca. 1 Stunde dunkel gestellt. Den Primärblättern wurde mit einer spitzen Pinzette die untere Epidermis abgezogen, Blattspitze und Basis entfernt und ca. 10 Blätter (≙ 1,5 g FG) mit der Unterseite in eine Petrischale auf den Waschpuffer gelegt.

Nach etwa 30 min. Vorplasmolyse auf Eis wurde der Waschpuffer gegen 10 ml Isolierungspuffer ausgetauscht. Die weitere Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 30°C im Wasserbad.

2.2.2. Nicotiana tabacum

(nach: Nagata und Takabe 1970, verändert)

Ca. 4 Wochen alte Pflanzen im 4. - 5. Blattstadium, d. h., mit rosettigem Habitus, wurden 20 h vor der Protoplastenisolierung dunkel gehalten.

Von jeder Pflanze wurden die zwei neuen, noch nicht voll expandierten Blätter verwendet. Die Blattunterseite wurde mit Carborundum (Körnung 120) bestreut und die Epidermis mit einem flachen Borstenpinsel sanft abgerieben, bis sich das Blatt dunkelgrün verfärbte (Beier und Bruening 1975). Das Carborundum wurde mit dest. Wasser abgespült und die Blätter abgetrocknet. Von den Blättern wurden die Mittelrippe und die Seitenrippen entfernt und die Blattstücke eine Stunde in Waschpuffer (RT) und anschließend in Isolierungspuffer inkubiert (ca. 1 g Blattgewebe auf 10 ml). Nach 2,5 - 3 Stunden im Schüttelwasserbad (30°C, ca. 30 Schübe/min.) waren die Blattstücke vollständig abgebaut.

2.2.3. Vicia faba

(nach: Schnabl 1981, Verhoek-Köhler 1984)

Nichtblühende, ca. 3 Wochen alte Bohnenpflanzen wurden 12 Stunden dunkel gestellt. Die Blätter wurden geerntet, ihre untere Epidermis abgezogen und die Mittelrippe entfernt.

Die so präparierten Blatthälften wurden 30 min. in Waschpuffer und anschließend 90 min. in Isolierungspuffer inkubiert. Der Wasch- und Isolierungspuffer enthielt als Osmotikum 0,4 M Sorbit, da sonst die Protoplasten zu stark plasmolysierten. Alle weiteren Lösungen waren 0,35 M.

2.2.4. Verwendete Medien

Waschpuffer:	0,6 M Sorbit	0,4 M (Vicia)
	1 mM $CaCl_2$	
	5 mM MES-KOH, pH 5,6	
Isolierungspuffer:		
Zusätzlich	10 mM Na-Ascorbat	
	0,5 % (G/V) BSA	
	zellwandabbauende Enzyme	
Avena sativa	2 % (G/V) Cellulysin	
Nicotiana tabacum	2 % (G/V) Cellulase Onozuka R10	
	0,5 % (G/V) Mazerozym R10	
Vicia faba	4 % (G/V) Cellulysin	

Um die Enzyme besser zu lösen, wurde mit 1 N KOH auf pH 8 titriert und anschließend mit 1 N HCl pH 5,6 eingestellt.

2.3. Reinigung der Protoplasten

Die Reinigung der verschiedenen Protoplasten verlief im wesentlichen gleichartig. Während der folgenden Reinigungsschritte wurde die Protoplastensuspension auf Eis gekühlt. Nach der Inkubation wurde die Suspension durch ein Nylonnetz mit 200 µm Maschenweite filtriert und der Rückstand 3 mal mit Aliquots des entsprechenden Waschpuffers gewaschen.

Für die Abtrennung der Protoplasten wurden die vereinigten Filtrate 1,5 min. bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Protoplasten in dem zurückgebliebenen Flüssigkeitsrest resuspendiert. 5 ml-Aliquots der in Saccharosepuffer aufgenommenen Protoplasten wurden in Reagenzgläser (10 ml) überführt und mit je 1 ml Sorbitpuffer vorsichtig überschichtet (De Filippis et al. 1980 nach Edwards et al. 1978).

Nach 2 min. Zentrifugation bei 250 g hatten sich Gewebereste und Zellwandfragmente im Pellet gesammelt, während die intakten Protoplasten an der Phasengrenze Saccharose/Sorbit angereichert waren und mit einer 1 ml Eppendorfpipette mit abgeschnittener Spitze abgehoben werden konnten.

Anschließend wurden die Protoplasten mit dem 10-fachen Volumen Sorbitpuffer verdünnt, abzentrifugiert (1,5 min., 300 g) und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Falls nicht anders angegeben, wurden die Protoplasten in Sorbitpuffer aufgenommen und auf Eis oder im Kühlschrank gelagert.

Saccharosepuffer: 0,5 M Saccharose, 0,35 M (Vicia)
1 mM $CaCl_2$
5 mM MES-KOH, pH 6,0

Sorbitpuffer: 0,5 M Sorbit, 0,35 M (Vicia)
1 mM $CaCl_2$
5 mM MES-KOH, pH 6,0

2.4. Herstellung vakuolenfreier Mesophyll-Protoplasten

Die Evakuolisierung erfolgte durch Ultrazentrifugation in einem isoosmotischen Percoll-Gradienten (Griesbach und Sink 1983). In 3,7 ml- (Rotor SW 60) beziehungsweise 5 ml-Zentrifugenbecher (Rotor SW 65) wurde 3,2 ml (4,5 ml) Percollpuffer pipettiert und mit 0,5 ml gereinigter Protoplastensuspension (ca. 10^6/ml) überschichtet.

Je nach Percoll-Charge wurde insgesamt zwischen 45 - 55 min. bei 23°C und 117000 g (34000 bzw. 40000rpm) zentrifugiert. Kam es auf eine gute Sauerstoffproduktion der evakuolisierten Protoplasten an, so erfolgte die Zentrifugation in zwei Schritten.

Im 1. Lauf (30 min.) wurde der Percollgradient teilweise vorgeformt und erst beim 2. Lauf (20 min.) die Protoplasten aufgetragen. Da sie dadurch kürzere Zeit dem hohen Schwerefeld und dem schädigenden Percollpuffer ausgesetzt waren, verbesserten sich ihre physiologischen Eigenschaften (Steingraber 1985).

Percollpuffer:

0,5 M Sorbit
100 mM Ca Cl_2
5 mM MOPS
in Percoll gelöst
pH 7,0 wurde mit MES bzw. MOPS eingestellt

Die Ausbildung des Percollgradienten veränderte sich in Abhängigkeit vom pH-Wert (siehe auch Steingraber 1985). Um eine konstante Gradientenausbildung zu garantieren, wurde der pH-Wert des Percollpuffers vor jeder Evakuolisierung mit MES bzw. MOPS auf pH 7,0 eingestellt.

Im Percollgradienten bilden sich unter dem Schwerkrafteinfluß Mikrogradienten, die dazu führen, daß sich die Zellorganellen in den Protoplasten ihrer spezifischen Dichte nach anordnen, was unter der membrandestabilisierenden Wirkung der hohen Ca-Konzentration schließlich dazu führt, daß sich die spezifisch leichtere Vakuole von der restlichen Zelle ablöst. So entstehen vier Fraktionen (Abb. 5).

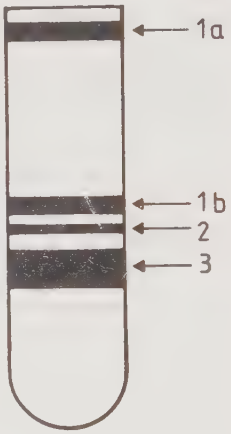


Abb. 5: Percollgradient nach der Evakuolisierung.

Unter der Oberfläche des Percollgradienten schwimmen einige Vakuolen (1a).
Im mittleren Teil des Zentrifugenröhrchens sind drei Banden sichtbar.
Die oberste besteht aus Vakuolen, die außerdem noch von einer Plasmalemmamembran umgeben sind (Pseudovakuolen, 1b).
Die unterste besteht aus Protoplasten ohne Vakuole (Miniprotoplasten, P(-), 3).
Dazwischen liegt eine dichte Platte aus Zellfragmenten (2).

Die Miniprotoplasten wurden 2 - 3 mal durch wiederholte Zentrifugation (2 min., 100 g) und Resuspendierung in Sorbitpuffer gereinigt.

Vakuolen und Pseudovakuolen (mit Plasmalemma) wurden in einem Stufengradienten wie in 2.3. beschrieben vom Percoll befreit. Dabei sammelten sie sich an der Interphase zwischen den beiden Lösungen an und konnten mit einer Eppendorfpipette abgehoben werden. Bei Bedarf wurde dieser Reinigungsschritt wiederholt.

Um die farblosen Vakuolen nicht bei der Reinigung zu verlieren, war es günstig, bereits die Ausgangsprotoplasten mit Neutralrot anzufärben. So erschienen Vakuolen und Pseudovakuolen immer deutlich als rote Banden.

2.5. Bestimmung von Bezugsgrößen

2.5.1. Zellzahl

Die Protoplastendichte wurde mit Hilfe eines Fuchs-Rosenthal-Hämocytometers bestimmt.

2.5.2. Längenmessungen

Die Messung erfolgte unter dem Mikroskop mit einem Okularmikrometer, das mit einem Objektmikrometer geeicht wurde. Durchschnittswerte von Zelldurchmessern wurden aus mindestens 100 Messungen gebildet.

2.5.3. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Der Chlorophyllgehalt der Protoplastensuspension wurde nach der Methode von Arnon (1949) spektralphotometrisch bestimmt.

Hierzu wurden 0,2 ml Protoplastensuspension in 0,8 ml 100 %-igem Aceton 30 min. auf Eis extrahiert. Das ausgefallene Protein bei 10 000 g 5 min. abzentrifugiert und die Extinktion des Überstandes gegen 80 %iges Aceton bei 645 nm und 663 nm gemessen.

Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$(20{,}3 * E_{645} + 8{,}05 * E_{663}) * \frac{\text{Verdünnungsfaktor}}{1000} = \text{mg } \frac{\text{Chl}}{\text{ml}}$$

2.6. Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1. Grundlagen

Eine Reihe von Substanzen, z. B. Chlorophyll, Öle, optische Aufheller, haben von sich aus die Eigenschaft, bei Anregung mit kurzwelliger Strahlung Fluoreszenzlicht zu emittieren. Diese Art der Fluoreszenz bezeichnet man als Eigen- oder Primär-Fluoreszenz.

Um nichtleuchtende Objektstrukturen sichtbar zu machen, müssen diese Präparate mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt werden. Diese durch Fluorochrome bewirkte Lichtemission bezeichnet man als Sekundär-Fluoreszenz. Der Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie liegt u. a. darin, leuchtende Objekte gegen einen dunklen Hintergrund betrachten zu können. Dieser Vorteil wird zunichte gemacht, wenn zu hohe Zell- oder Farbstoffkonzentrationen, alte Färbelösungen oder Farbstoffe verwendet werden, deren Emission mit Primärfluoreszenzen zusammenfällt.

2.6.2. Farbstoffe

Von den Farbstoffen wurden 100-fach konzentrierte Stammlösungen mit dem jeweils geeigneten Lösungsmittel hergestellt und diese lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wurden diese mit Protoplastenmedium 50-fach verdünnt und 1 : 1 mit der Probe vermischt. Bei größeren Mengen wurde die Stammlösung direkt der Zellsuspension zugegeben.

Die Verdünnung wurde so gewählt, daß die Lösungsmittelkonzentrationen auch bei Verwendung mehrerer Farbstoffe immer unterhalb 1 % lag. Vergleichsmessungen und -beobachtungen wurden mit der entsprechenden Lösungsmittelkonzentration gemacht. (Verwendete Farbstoffe siehe Tabelle 1).

2.6.3. Fluoreszenz-Mikrophotographie

Für die Aufnahmen wurden, je nach Mikroskopierart und Helligkeit der Präparate, folgende Umkehrfilme verwendet:

Ektachrome 100 (Tageslicht)
Ektachrome 160 (Kunstlicht)
Ektachrome 400 (Tageslicht)
Ektachrome P800/1600 (Tageslicht)

Wegen der unterschiedlichen Farbempfindlichkeit der einzelnen Filmfabrikate und der spektralen Charakteristik des elektronischen Belichtungsmessers, wurde über Probeaufnahmen die richtige Einstellung an der Kamera ermittelt.

Um Farbverfälschungen zu vermeiden (Schwarzschildeffekt) wurde über die Wahl der Filmempfindlichkeit die Belichtungszeit möglichst unter 10 s eingestellt.

Bei Mehrfachfärbungen (z. B. FITC, RITC) wurde zuerst der schnell ausbleichende Farbstoff (FITC) mit dem entsprechenden Filterblock aufgenommen.

Viele Fluoreszenzfarbstoffe bleichen durch lange Belichtung aus. Besonders Fluorescein-Derivate haben eine starke Tendenz zum "Photobleaching". Deshalb wurden die Beobachtungs- und Belichtungszeiten möglichst kurz gehalten.

Um vor allem bei Aufnahmen einen guten Kontrast zu bekommen, wurde dem Präparat Hämoglobin (ca. 4 mM) zugegeben. Hämoglobin wirkt als Fluoreszenz-Quencher und unterdrückt die Hintergrund-Fluoreszenz des Mediums (Bruning 1982). Neutralrot und Evan's Blue wurden ebenfalls zur Konstrastierung von Fluoreszenzfärbungen eingesetzt.

Tabelle 1: Farbstoffe und ihre Eigenschaften

Farbstoff	mittlere Anregungswellenlänge (nm)	mittlere Fluoreszenzwellenlänge (nm)	Leitz-Auf-Licht-Filterblock	Anwendungsgebiet	Lösungsmittel	Konzentration (% G/V)
Acridinorange	470	530	I 2/3	Bakterien, DNA, RNA, Vakuolen, pH-Messung	Wasser	0,01
Auramin 0	460	550	I 2/3	Bakterien, DNA	Ethanol	0,01
Benzoxanthen-Gelb H2495	430	475	D	Protein	Wasser	0,1
Berberinhemisulfat	430	550	G	Bakterien, Zellkerne	Wasser	0,01
Bisbenzimid H33268, H33342	350	450	A	DNA, Zellkerne	Wasser	0,001
Calcofluor White	365	435	A	Zellwand	Wasser	0,01
DAPI	360	460	A	Kern, Chromosomen	Wasser	0,0001
Ethidiumbromid	480	590	N 2	DNA, Zellkerne	Wasser	0,01

Fluorescein	490	530	I 2/3	pH-Messung, Tracer	Ethanol	0,001
FDA	490	530	I 2/3	Zytoplasma, Vitalfluorochrom	Aceton	0,005
FITC	490	540	I 2/3	Membranen, Proteine	Ethanol	0,005
Lucifer Yellow CH	430	540	E 3	intrazellulärer Tracer	Wasser	0,01
Propidiumjodid	480	590	N 2	DNA	Ethanol	0,001
Rhodamin B	550	580	N 2	Vakuolen	Wasser	0,01
RITC	550	580	N 2	intrazellulärer Tracer Vitalfluorochrom, Mitochondrien	Ethanol	0,005
Bromphenolblau	360	verschiedene Emissionswellenlängen		Unterscheidung lebender und toter Zellen	Wasser	0,5
Evan's Blue						
Methylenblau						
Phenosafranin					Wasser	0,1
Trypanblau						
Neutralrot				Vitalfärbung, Vakuolen	Wasser	0,01

2.6.4. Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Markierung von Zellen

Eines der Hauptprobleme bei der Fusion von Protoplasten ist die Selektion der Hybride von den Ausgangszellen. Eine Möglichkeit besteht darin, die Protoplastenpopulationen mit verschiedenen Fluorochromen anzufärben (Galbraith und Mauch 1980).

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und
Rhodamin-Isothiocyanat (RITC)
wurden als Stammlösungen den Protoplastensuspensionen zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Farbstoffe akkumulieren in den Protoplasten.

Durch zweimaliges Waschen mit Fusionslösung wurde der restliche Farbstoff entfernt.

FITC-gefärbte Protoplasten flureszieren grün-gelb.
RITC-gefärbte Protoplasten fluoreszieren rot.

Hybridzellen aus FITC und RITC gefärbten Protoplasten zeigen beide Fluoreszenzfarben, wenn sie nacheinander mit dem jeweils spezifischen Filterblock beobachtet werden.

2.7. Vitalitätsbestimmung von Protoplasten

Es gibt eine Reihe von Merkmalen, die zur Vitalitätsüberprüfung herangezogen werden.

2.7.1. Optische Merkmale

Sphärische Form

Im Phasenkontrastmikroskop erscheinen intakte Protoplasten deutlich glatt und rund, während bei geplatzten Protoplasten die Oberfläche durch die außenliegenden Chloroplasten wellig ist.

Chloroplastenverteilung

Bei frisch isolierten Protoplasten sind die Chloroplasten über die Oberfläche gleichmäßig verteilt. Ältere oder geschädigte Protoplasten haben eine polare Anordnung.

Zytoplasmaströmung

Kontraktile Mikrofilamente erzeugen unter Energieverbrauch eine Zytoplasmaströmung. Diese kann man an der Bewegung von Zelleinschlüssen erkennen. Die Chloroplasten verhindern aber meist eine Beobachtung des Zellinnern.

Osmotische Aktivität

In hyperosmotischer Lösung schrumpfen intakte Protoplasten. In hypoosmotischer Lösung schwellen sie. Ohne Schädigung konnte die Osmolarität von Avena-Protoplasten zwischen 0,3 M - 0,7 M verändert werden. Evakuolisierte Protoplasten reagieren empfindlicher. Die Änderungen im Durchmesser liegen dabei unter 10 %, sind also schlecht meßbar.

2.7.2. Vitalfärbungen

Even's Blue

Even's Blue ist membranimpermeabel. Tote Protoplasten werden nach 10 min. blau angefärbt (Gaff und Okong'O-ogola 1971).

Phenosafranin

Phenosafranin ist wie Evan's Blue ein Ausschlußfarbstoff. Defekte Protoplasten erscheinen rot (Widholm 1972).

2.7.3. Vitalfluorochromierung

Um die Intaktheit von Protoplasten festzustellen, wird häufig der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-diacetat (FDA) benützt. FDA permeiert als ungeladenes Molekül das Plasmalemma. In der Zelle werden die Acetatreste durch Esterasen abgspalten, wobei Fluorescein als fluoreszierendes Produkt freigesetzt wird. Das geladene Fluorescein diffundiert nur sehr schlecht durch Membranen und reichert sich deshalb in Zellen mit intaktem Plasmalemma an. (Larkin 1976)
Fluoreszein scheint nicht an Membranen oder Organellen gebunden zu sein, sondern ist homogen im Zytoplasma verteilt.

Nach Anregung mit Blaulicht leuchtet das Zytoplasma intakter Protoplasten gelb-grün, während Zellen, deren Membran geschädigt ist, beziehungsweise die Esterasen inaktiv sind, nur rote Chlorophyllfluoreszenz zeigen.

Ethidiumbromid (EB) färbt intakte Zellen nur sehr langsam an, Kerne und geplatzte Protoplasten leuchten rot. EB interkaliert in DNA und RNA (Waring 1966) und wirkt dadurch mutagen.

Berberin wurde als Hemisulfat verwendet. Es hat die gleichen biologischen Eigenschaften wie EB, fluoresziert jedoch gelb.

2.7.4. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen

2.7.4.1. Zellwandsynthese und Teilung

Die Neubildung von Zellwand kann durch Anfärbung mit Calcofluor White (CFW) gezeigt werden (Nagata und Takebe 1970). Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in Zellulosefibrillen, hemmt damit aber auch die weitere Synthese.

2.7.4.2. Zellelektrophorese

Wie bei den meisten Zellen, besteht auch bei Protoplasten eine elektrische Spannung zwischen dem Zytoplasma und dem Außenmedium. Diese Potentialdifferenz entsteht durch die unterschiedliche Ionenzusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösungen auf beiden Seiten der Plasmalemmamembran und wird daher auch als Membranpotential bezeichnet. Im elektrischen Gleichstromfeld wandern intakte Protoplasten zur Anode, d. h. die Zelle ist negativ geladen. Ist das Plasmalemma defekt, so kann kein Potential aufgebaut werden, die Zellen wandern also nicht.

Dieser Vitalitätstest wurde mit Protoplasten nach Elektropermeabilisierungs- und Fusionsexperimenten durchgeführt. Dazu wurde an die Drahtkammer (Elektrodenabstand 200 µm) eine Gleichstromquelle (3 - 6 V) angelegt oder es wurden mit dem Fusionsgenerator mehrere Gleichstrompulse gegeben (10 V, 99 µs).

2.7.4.3. Glycolatoxidase Test

Von Nishimura et al. (1985) wurde die Glyolatoxidase-Aktivität als Index für die Intaktheit von Protoplasten verwendet.

Glycolatoxidase ist in den Peroxisomen der Zelle lokalisiert. Bei Zugabe von Glycolat zu einer Protoplastensuspension wird O_2 verbraucht. Dies beruht auf der Glycolatoxidase-Aktivität

zerstörter Protoplasten, da Glycolat nicht in intakte Protoplasten eindringt. Diese Messung wurde mit der O_2-Elektrode ausgeführt und quantitativ ausgewertet.

Durchführung: Messung der Respiration von 1 ml Protoplastensuspension in Elektrodenpuffer

+ 50 µl Antimycin A (Hemmung der Respiration)	Rate 1
+ 0,1 ml Glycolat (75 mM)	Rate 2
+ 50 µl Triton X 100 (1 %)	Rate 3

Berechnung:
Rate 3 - Rate 1 = 100 % (Gesamt-Aktivität)
Rate 2 - Rate 1 = % defekte Protoplasten

2.7.4.4. Polarographische Sauerstoffbestimmung

Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung und der respiratorische Sauerstoffverbrauch von Protoplasten wurden in einer O_2-Elektrode gemessen (Delieu und Walker 1972).

0,2 ml Protoplastensuspension und 0,8 ml Elektrodenpuffer wurden in die thermostatisierte Küvette pipettiert und bei 20°C mit Hilfe eines kleinen Magnetstäbchens gerührt. Über einen Schreiber wurde bei Belichtung (ca. 150 W/m²) beziehungsweise Verdunkelung die Änderung der O_2-Konzentration gemessen.

Als Eichpunkte dienten O_2-gesättigtes dest. Wasser vor und nach der Zugabe von Na-Dithionit (100 % $\hat{=}$ 0,276 µmol O_2/ml, 20°C). Die Sauerstoffproduktion wurde auf 10^6 Protoplasten oder mg Chlorophyll bezogen.

Elektrodenpuffer: 0,5 M Sorbit
7,5 mM $CaCl_2$
5 mM $NaHCO_3$
25 mM Tricin, pH 7,6

Um bei den evakuolisierten Protoplasten ein Absinken in der Küvette zu verhindern, wurde Sorbit durch Raffinose ersetzt.

2.7.5. Nachweis der photosynthetischen Sauerstoffproduktion einzelner Protoplasten durch die Chemotaxis von Bakterien

2.7.5.1. Historisches

Dieses klassische Experiment, das von Engelmann (1881) erstmals beschrieben wurde, beruht auf der Eigenschaft aerober Bakterien, sich in einem O_2-Gradienten in Richtung höherer Konzentrationen zu bewegen (Aerotaxis).

Engelmann projizierte ein Mikrospektrum der Länge nach auf einen Algenfaden und zählte die Bakterien, welche sich nach einiger Zeit in einem bestimmten Spektralbereich anreicherten. Dadurch ermittelte er das Wirkungsspektrum der Photosynthese für Grün- und Rotalgen (Engelmann 1881, 1882; Pfeffer 1897).

Ein geeignetes Bakterium, das auch von Engelmann benutzt wurde, ist Pseudomonas aeruginosa.

2.7.5.2. Pseudomonas aeruginosa

ist ein monopolar, polytrich begeißeltes Gram-negatives Stäbchen, das bei der Teilung kurze Ketten bildet.

Die Energiegewinnung erfolgt durch aerobe Atmung. Fehlt Sauerstoff, wird Nitrat als terminaler Wasserstoff-Acceptor unter Freisetzung von molekularem N_2 verwendet (Nitrat-Atmung). Pseudomonas aeruginosa ist also fakultativ aerob. Die zur Denitrifikation notwendigen Enzyme werden aber nur unter anaeroben Bedingungen gebildet. Sauerstoff unterdrückt die Bildung der Nitrat- und Nitritreduktase. Pseudomonas aeruginosa ist ein aquatisches Bakterium und obiquitär verbeitet. Bei vorgeschädigten Personen kann es Infektionen hervorrufen, (Cross 1985) deshalb wurden die Präparate in 2 %igem Lysoformin gelagert und Bakteriensuspensionen bei 135°C totautoklaviert.

2.7.5.3. Kultur von Pseudomonas aeruginosa

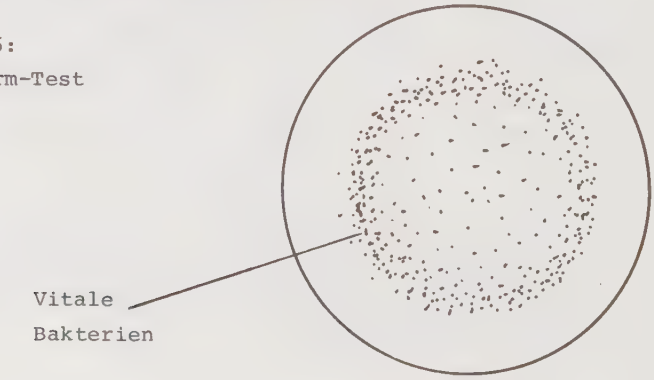
Pseudomonas aeruginosa (DSM 50071) wurde auf dem mit 1,5 % Agar verfestigten, modifizierten Nährmedium 1 angezogen (Claus 1983, Schopfer 1970).

Von einer Schrägagarkultur beziehungsweise Petrischale wurde das Bakterium auf 10 ml Flüssigkeitsmedium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane steril überimpft und für 8 - 12 Stunden bei 37°C auf dem Rundschüttler bei guter Belüftung geschüttelt (Wattebausch), so daß die Suspension vor Versuchsbeginn kräftig getrübt war.

Nährmedium: Pepton 5,0 g
Fleischextrakt 3,0 g
NaCl 2,0 g
KCl 0,1 g
mit dest. Wasser auf 1 l, pH 7,0
sterilisiert bei 121°C für 15 min.

Bei mehrmaliger Lagerung der Bakterien trat Vitalitätsverlust ein. Um wieder möglichst bewegliche Bakterien zu bekommen, wurde von Zeit zu Zeit ein Schwarmtest durchgeführt. Eine Petrischale mit Weichagar 0,35 % wurde in der Mitte angeimpft und mehrere Tage kultiviert. Von dem sich kreisförmig ausgebildeten Plaque wurden die aktivsten Bakterien am äußersten Rand weiterkultiviert.

Abb. 6:
Schwarm-Test



2.7.5.4. Versuchsdurchführung

Für den Versuch wurde eine Bakteriensuspension in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet (OD bei 578 nm max. 1,5). 1 ml Bakteriensuspension wurde in ein Eppendorfhütchen überführt und bei 10 000 g 1 min. abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml Elektrodenpuffer resuspendiert und offen stehen gelassen.

5 µl verdünnte Protoplastensuspension (10^4/ml) und 5 µl Bakterien wurden auf einem Objektträger vermischt und das Deckglas mit Vaseline abgedichtet. Das Präparat wurde mit der Mikroskoplampe beleuchtet (Halogenlampe 320 W/m²). Nach einigen Minuten sammelten sich die Bakterien um die Protoplasten an. Die Betrachtung erfolgte bei 320 - 400-facher Vergrößerung im Phasenkontrast oder Dunkelfeld. Für die Phasenkontrastaufnahmen wurde ein Mikroblitz (100 W/s) und Tageslichtfilm (Ektachrome 100) verwendet. Die Dunkelfeldaufnahmen wurden mit Ektachrome 160 oder 400 ASA gemacht.

Die kinetische Darstellung der lichtabhängigen O_2-Produktion einzelner Protoplasten basierte auf der Streulichtmessung bei Dunkelfeldbeleuchtung. Dazu wurde ein Mikroskopphotometer verwendet und die Öffnung der Meßblende auf etwa den doppelten Protoplastendurchmesser eingestellt. Die Änderungen der Bakteriendichte in der unmittelbaren Umgebung eines Protoplasten wurden so gegen einen konstanten Hintergrund (Protoplast + tote Bakterien) photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte in der Lichtphase kontinuierlich und in der Dunkelphase in 15 - 30 s Intervallen für 2,5 s. Die Meßwerte wurden mit einem Schreiber aufgezeichnet oder auf einen Rechner (HP 87) übertragen und ausgewertet.

Es wurden nur relative Änderungen gemessen. Eine Eichung auf absolute Werte (O_2-Konzentration) war nicht möglich.

2.8. Elektrisch induzierte Fusion

2.8.1. Theorie

Die Methode der elektrischen Fusion von Zellen durch feldinduzierte Membranveränderung wurde von Zimmermann und Pilwat zuerst beschrieben und später durch Anwendung der dielektrophoretischen Sammlung (Pohl 1978) verbessert (Zimmermann und Vienken 1984, Zimmermann et al. 1985).

Der Vorgang läßt sich in folgende Schritte gliedern:

1. Herstellung eines engen Membrankontaktes zwischen den zu fusionierenden Zellen durch Dielektrophorese.
2. Elektrischer Durchbruch der Membranen durch kurzzeitige Applikation eines elektrischen Feldes hoher Intensität.
3. Fusion und Abrundung benachbarter Zeller zu einer Hybridzelle und Ausheilung der Membranen.

Im folgenden sollen die drei Schritte näher erläutert werden.

2.8.1.1. Dielektrophorese

Die als Trennmethode bekanntere Elektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld.

Im Gegensatz dazu versteht man unter Dielektrophorese die Bewegung eines neutralen oder geladenen Körpers auf Grund seiner Polarisation in einem inhomogenen elektrischen Feld.

Protoplasten sind negativ geladen und wandern zur positiven Elektrode. Zusätzlich werden in ihnen durch das äußere Feld Dipole induziert; doch liefert diese Polarisierung in einem homogenen Feld keinen Beitrag zur Wanderung, da die Feldstärken auf beiden Seiten gleich groß sind. Dies bedeutet aber auch, daß ein neutrales Teilchen unter diesen Bedingungen nicht wandern würde (Abb. 7a).

In einem inhomogenen elektrischen Feld tritt dagegen nach wie vor Elektrophorese auf. Gleichzeitig wird aber auch eine Wanderung neutraler Teilchen beobachtet, im allgemeinen in Richtung höherer Feldstärke (Abb. 7b). Die Wanderung eines neutralen Teilchens in einem inhomogenen elektrischen Feld beruht darauf, daß die Feldstärke auf beiden Seiten des in der Zelle induzierten Dipols verschieden groß ist.

Die Richtung der Nettokraft ändert sich nicht, wenn man die Richtung des Feldes durch Umpolen der externen Spannung umkehrt. Die elektrophoretische Wanderung, die nur durch die Ladung der Zelle bedingt ist, erfolgt dagegen in umgekehrter Richtung. Einem hochfrequenten elektrischen Wechselfeld kann die Zelle nicht mehr folgen und oszilliert um eine bestimmte Position im Feld, die Ladung ist "maskiert". Nur die dielektrophoretische Wanderung findet statt, wobei sich die Zellen in der Regel längs der elektrischen Feldlinien in Richtung höherer Feldstärke bewegen (Dielektrizitätskonstante der Zellen größer als die des Mediums, positive Dielektrophorese, Abb. 7c). Wenn die Zellen bei ihrer Wanderung in das Gebiet höherer Feldstärke sich längs der Feldlinien einander nähern, ziehen sie sich aufgrund ihrer Dipolmomente an (Abb. 7d). Unter bestimmten Bedingungen kann die Differenz der Dielektrizitätskonstanten auch negativ sein. Dann ist eine negative Dielektrophorese, d. h. Wanderung in ein Gebiet geringerer Feldstärke zu beobachten. Die Ursache hierfür ist darin zu sehen, daß die Dielektrizitätskonstante einer Zelle (oder der Membran) eine Funktion der Frequenz des Feldes ist, da die Membran (unter Einschluß der Grenzschichten zu den Lösungen hin) inhomogen ist. Es kommt zu Grenzflächenpolarisationen, die sich makroskopisch in einer Änderung der Dielektrizitätskonstante wiederspiegeln (Maxwell-Wagnersche Dispersion). Deshalb kann bei bestimmten Frequenzen die Dielektrizitätskonstante der Zelle kleiner werden als die der umgebenden Lösung.

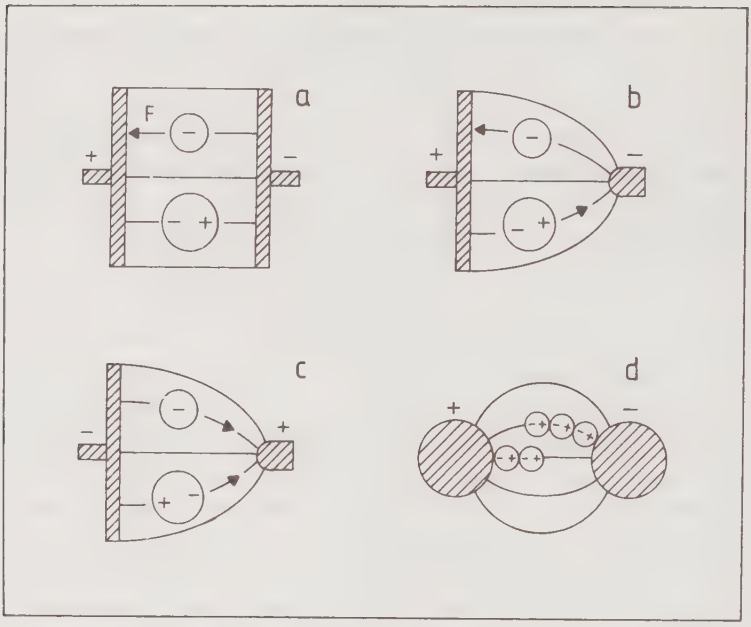


Abb. 7: Schematische Darstellung der Elektro- und Dielektrophorese, für einen geladenen und einen ungeladenen Körper

a) Elektrophorese eines geladenen Teilchens im homogenen Feld.
b) Elektro- und Dielektrophorese im inhomogenen Feld.
c) Die dielektrophoretische Kraft ist unabhängig von der Polarität des elektrischen Feldes.
d) Durch die Anziehung der in den Zellen induzierten Dipole lagern sich diese entlang der Feldlinien an den Elektroden in Kettenform an.

Ein limitierender Faktor bei der dielektrophoretischen Aneinanderreihung von Zellen ist die elektrische Leitfähigkeit des Mediums. Wenn diese zu hoch ist, fließt ein zu großer Strom in der Lösung. Dieser bewirkt Wärmeentwicklung und somit Turbulenzen, die die Bildung von "Perlenketten" verhindern können. Daher wurde möglichst in nichtionischen Lösungen (spezifische Leitfähigkeit < 10 µS/cm) gearbeitet. Die Osmolalität der Lösung wurde mit Nichtelektrolyten eingestellt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde Sorbit verwendet.

2.8.1.2. Elektrischer Durchbruch

Technische Kondensatoren können bekanntlich nur bis zu einer bestimmten Höchstspannung aufgeladen werden. Oberhalb dieses kritischen Wertes, der vom Plattenabstand und vom Dielektrikum abhängt, kommt es zu einem elektrischen Durchbruch (dielektrischer Durchbruch) des Kondensators. Der elektrische Durchbruch ist mit einer extremen Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit des Kondensators verbunden, die in der Regel irreversibel ist, d. h. der Kondensator wird zerstört. Bei "selbstheilenden" Kondensatoren regenerieren sich dagegen die ursprünglichen Widerstands- und Kapazitätseigenschaften wieder. Biologische Membranen und künstliche Lipid-Doppelschichten verhalten sich unter bestimmten experimentellen Bedingungen beim elektrischen Durchbruch wie selbstheilende Kondensatoren in der Technik. Voraussetzung für einen reversiblen elektrischen Durchbruch bei Zellmembranen ist, daß die kritische Membranspannung innerhalb von ns bis µs erreicht wird.

Der Mechanismus des elektrischen Membrandurchbruchs ist noch weitgehend ungeklärt. Es gibt eine Reihe von Modellvorstellungen und experimentellen Hinweisen. Viele Autoren vermuten, daß hohe elektrische Felder zu Poren in der Membran führen (Abidor et al. 1979, Schwister und Deuticke 1985). Eine theoretische Analyse dieses Phänomens zeigt, daß es auch durch elektromechanische Kompression erklärt werden kann (Sugar, Neumann 1984; Dimitrov 1984). Die durch Polarisation gebildeten Ladungen werden durch das Membraninnere, das ein Dielektrikum darstellt, getrennt. Entgegengesetzte Ladungen ziehen sich an und üben auf die Membran eine Kraft aus. Die Membrandicke nimmt an einzelnen Punkten ab. Oberhalb einer bestimmten Kompression wird sie instabil und es entstehen lokale Störstellen, durch die ein Ladungsausgleich stattfindet. Jedoch ist auch dieses elektromechanische Konzept zu einfach, um die komplexen molekularen Ereignisse und alle zum Durchbruch führenden Prozesse befriedigend zu erklären.

2.8.1.3. Fusion und Abrundung

Bei aneinandergelagerten Zellen mit engem Membrankontakt (1 - 2 nm) führt der elektrische Durchbruch zur Verschmelzung dieser Zellen. Nach der Modellvorstellung von Zimmermann (1982) diffundieren im Kontaktbereich Lipidmoleküle aus der einen Membran in die andere. Die Membranen bilden ein Kontinuum durch Brücken mit sehr kleinem Krümmungsradius. Um die Oberflächenspannung zu erniedrigen, kommt es zur Abrundung des Fusionsproduktes unter Bildung einer Kugel. Das überschüssige Membranmaterial wird durch Bildung von Vesikeln entfernt (Vienken et al. 1983). Die Abrundung dauert je nach Zelltyp und physiologischem Zustand 1 - 30 min. (Verhoek-Köhler et al. 1983).

2.8.2. Experimenteller Aufbau

Der Versuchsaufbau besteht aus einer Fusionskammer, die unter dem Mikroskop beobachtet werden kann. Bei einem Arbeitsplatz wurde ein Fusionsgenerator benutzt, der das für die Sammlung der Zellen notwendige hochfrequente Wechselfeld erzeugt. Zur Fusion wird dieses automatisch abgeschaltet und es folgen ein oder mehrere kurze Gleichstrompulse. Im Prinzip besteht dieses Gerät also aus drei Komponenten: Sinusgenerator, Pulsgenerator und ein Trigger, welcher die beiden Einheiten umschaltet.

Ein zweiter Arbeitsplatz, bestehend aus diesen Einzelgeräten, ist in Abb. 9 schematisch dargestellt.

Die applizierten Spannungen wurden mit einem Oszilloskop gemessen und sind in Spitzenwerten ($\hat{U}$) angegeben.

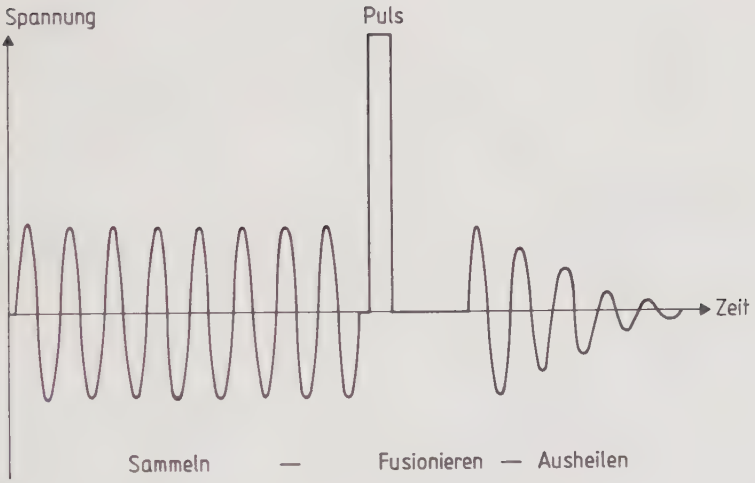


Abb. 8: Schematische Darstellung des Fusionsablaufs

Während der Pulszeit wird das Wechselfeld automatisch abgeschaltet um eine Störung des Fusionsprozesses zu vermeiden. Nur für photographische Aufnahmen wurde die Sammelspannung nach dem Puls wieder angelegt, um ein Verdriften der Protoplasten zu verhindern.

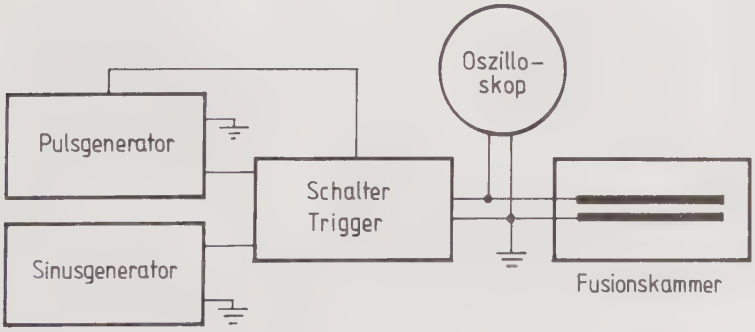


Abb. 9: Blockdiagramm der Fusionsapparatur

2.8.3. Fusionskammern

Im einfachsten Fall besteht die Fusionskammer aus einem Glasobjektträger, auf dem im Abstand von 100 - 300 µm zwei parallele NiCr-Drähte (Ø 100 oder 200 µm) aufgeklebt sind (Abb. 10).

Für die Fusion größerer Mengen oder die Beobachtung im homogenen Feld sind statt Drähten 0,5 - 5 mm dicke Platten aus Silber oder Messing im Abstand von 0,5 - 2 mm auf dem Objektträger befestigt (Abb. 11).

Zur sterilen Massenfusion von Zellen wurde von Naton (1986) eine Mäanderkammer entwickelt und hergestellt. Auf einer Glasplatte 5 x 5 cm sind in Form zweier ineinandergeschobener Kämme Chromelektroden aufgedampft (Schichtdicke 0,5 µm, Abstand 90 µm). Die Glasplatte wird in einen verschließbaren Teflonträger eingesetzt und über Steckkontakte mit dem Fusionsgenerator verbunden (Abb. 12). Diese Kammer basiert auf einer Idee von Zimmermann und Vienken (1982) und der als Trommelkammer verwirklichten Ausführung (Zimmermann et al. 1985). Die Kammer stand als Leihgabe zur Verfügung. Bei ihr sind auf einer runden Glasscheibe die Elektroden radial angebracht (Abb. 13).

Abb. 10: Drahtkammer, der Fusionsraum beträgt maximal 5 µl.

Abb. 11: Plattenkammer; das Fusionsvolumen beträgt (15 * 4 * 1) mm^3 = 60 µl
Die Kammer besitzt keinen Totraum, das gesamte Volumen wird vom elektrischen Feld erfaßt.

Abb. 12: Mäanderkammer, die Protoplastensuspension wird auf die Elektrodenfläche pipettiert. Der Totraum, die Elektrodenfläche beträgt 50 %.

Abb. 13: Trommelkammer, auf die gesamte Oberfläche läßt sich 1 ml Protoplastensuspension aufbringen. Der Fusionsvorgang kann mit dem Inversmikroskop beobachtet werden.

2.8.4. Darstellung von Mikrofeldern

Ein elektrisches Feld läßt sich am anschaulichsten durch Feldlinien beschreiben. Feldlinien verbinden positive mit negativen Ladungen. Die Dichte der Feldlinien ist ein Maß für die Stärke des Feldes und eine Feldlinie folgt an jedem Punkt der Richtung der elektrischen Feldstärke oder der Kraft, die dieses Feld ausübt. Damit ist ein elektrisches Feld vollständig beschrieben.

Man kann den Feldlinienverlauf in verschiedener Weise sichtbar machen. In einem klassischen Versuch bringt man hierzu die Elektroden in eine Schale mit einer viskosen gut isolierten Flüssigkeit (Terpentin- oder Rizinusöl) und streut feinkörnigen Grieß darauf. Die Grießkörner reihen sich kettenförmig an, denn in ihnen wird Ladung durch Influenz getrennt, sie werden zu elektrischen Dipolen. Dabei ziehen sich die entgegengesetzten Ladungen benachbarter Körner an. Man sieht so einen ebenen Schnitt durch das räumlich ausgedehnte Feld. Dasselbe, was man hier makroskopisch beobachten kann, passiert im mikroskopischen Maßstab, wenn man statt Grießkörnern Protoplasten verwendet - die Kettenbildung erfolgt entlang der Feldlinien. Zwischen ihnen kann man sich noch beliebig viele Feldlinien denken.

Um solche Mikrofelder in der Umgebung von Protoplasten darzustellen, benötigt man Teilchen, die wesentlich kleiner sind als Protoplasten (Ø 20 - 50 µm) aber noch über der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops liegen. Dafür eignen sich nach Füredi und Valentine (1962) Bakterien, Stärkekörner, Aluminiumpulver und Polystyrolkügelchen.

Diese Betrachtungen, die für ein stationäres Feld gemacht wurden, gelten im Wesentlichen auch für ein elektrisches Wechselfeld. Dabei unterbleiben elektrophoretische Erscheinungen wie das Wandern von geladenen Teilchen.

Für die Versuche wurde ein Wechselfeld von 1 MHz verwendet.

Zur Darstellung der Mikrofelder wurden folgende Materialien eingesetzt:

Bakterien (Pseudomonas aeruginosa)	Ø 1 µm
Polystyrolkügelchen	Ø 4 µm
Chloroplasten	Ø 5 µm
Glaskügelchen	Ø 3 - 10 µm

Um die Eigenbewegung der begeißelten Bakterien auszuschalten, wurden diese durch Einfrieren in 20 mM $CaCl_2$-Lösung bei -20°C immobil gemacht.

2.8.5. Elektropermeabilisierung

Mit Hilfe der Methode des reversiblen elektrischen Durchbruchs ist es möglich, fremde Substanzen in lebende Zellen einzuschleusen, ohne dabei die Eigenschaften der Zellmembran nachhaltig zu verändern (Zimmermann et al. 1974).

Die Protoplasten wurden in isotonischem, ionenfreiem Medium suspendiert und in der Drahtkammer prozessiert. Damit sie nicht aus dem Elektrodenbereich heraus auf den Boden absinken konnten, wurde ein Medium mit der Schwebedichte der Protoplasten verwendet.

Hafermesophyllprotoplasten 0,5 M Sorbit/Sacch., 1 : 1
evakuolisierte Protoplasten 0,5 M Raffinose

Dem Präparat wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn als Marker Fluorochrome zugegeben. Das für die Fusion notwendige Sammeln der Zellen unterblieb. Der Puls wurde mit dem Zimmermann-Fusionsgenerator oder dem HP-Pulsgenerator ausgeführt.

2.9. Geräte und Chemikalien

Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Aldrich Chemie, Steinheim:
Inhibitoren (DCMU, DBMIB, DPC, Poly-L-Lysin)

Boehringer Mannheim:
Puffersubstanzen

Calbiochem (Hoechst), Frankfurt/Main:
Cellulysin, Bisbenzimide

Carborundum Schleifmittelwerk, Düsseldorf:
Caborundum GC 120

Difco (Hedinger), Stuttgart:
Bacto-Agar

Merck, Darmstadt:
verschiedene Zucker, Evans Blau, Neutralrot DCPIP

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:
Percoll, Density Marker Beads

Polysciences, Warrington (USA):
Polybeads fluoreszierend 4 µm, Glaskügelchen 3 - 10 µm, Calcofluor White

Serva Feinbiochemiva, Heidelberg:
Cellulase Onozuka R-10, Macerozym R-10, Murashige und Skoog Pflanzensalze, Raffinose

Sigma Chemie, München:
Fluorochrome, Hämoglobin

Geräte

Beckmann, München:
Rotoren SW 60 und SW 65

GCA, Corp., Chicago (USA):
Zimmermann Zellfusionsgenerator

Hewlett Packard, Böblingen:
Pulsgenerator Typ 214 B, Computer 87 XM

Hameg, Frankfurt:
Oszilloskop HM 203-5

Hansatech (Bachofer, Reutlingen):
Sauerstoffelektrode nach Clark

Kontron, Eching:
Ultrazentrifuge TGA 65

Leitz, Wetzlar:
Lichtmikroskope Dialux EB 20, Laborlux D, Diavert, Fluoreszenz-Auflichtilluminator Phloemopak, Mikroskopphotometer MPV compakt, Mikroblitz 100 W/s

LKB, München:
Photometer Ultrospec 4050

Meßgerätewerk Lauda:
Thermostat Lauda RC 6

Toellner Elektronik, Frankfurt/Main:
Funktionsgenerator Typ TE 7702

Wild, CH-Heerbrugg:
Mikroskopkamera MPS 51, Photoautomat MPS 45

3. ERGEBNISSE

3.1. Protoplastenisolierung

3.1.1. Mesophyllprotoplasten

Die Ausbeute an gereinigten, intakten Protoplasten zeigte bei allen Pflanzen starke Schwankungen. Generell lag sie in den Wintermonaten niedriger als im Sommer. Eine Inaktivierung der proteolytischen Enzyme im Isolierungspuffer durch 10-minütiges Erhitzen auf 50°C bei pH 6,5 (Van der Valk 1984) brachte keine zusätzliche Steigerung der vorher schon hohen Protoplastenqualität.

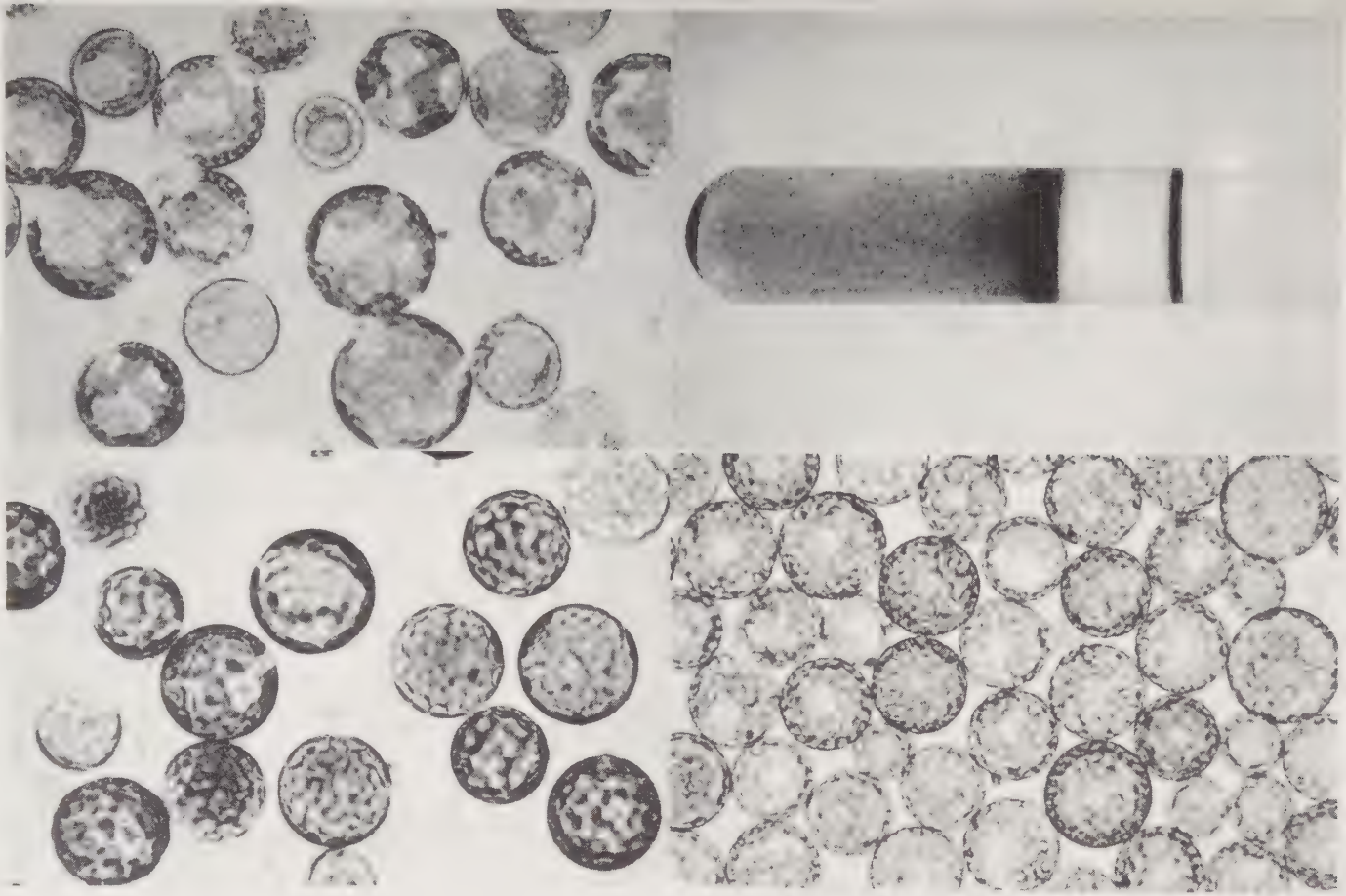
Nachfolgend sind für die gewonnenen Protoplasten zur Isolierung und Charakterisierung typische Werte angegeben.

Abb. 14: Reinigungsschritt; über einen diskontinuierlichen Saccharose-Sorbit-Gradienten wurde eine weitgehend reine Protoplastenfraktion erhalten (Bande an der Grenzschicht der beiden Lösungen).

Abb. 15: Avena sativa - Mesophyll-Protoplasten (500-fach)

Abb. 16: Nicotiana tabacum - Mesophyll-Protoplasten (500-fach)

Abb. 17: Vicia faba - Mesophyll-Protoplasten (500-fach)



3.1.1.1. Avena sativa

Ausbeute:	$3 - 12 * 10^6$	$\frac{\text{Protoplasten}}{\text{g FG}}$
Chlorophyllgehalt:	0,08 - 0,2	$\frac{\text{mg Chl.}}{10^6 \text{ Protoplasten}}$
O_2-Entwicklung:	4 - 12	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{10^6 \text{ Protoplasten} * \text{h}}$
	30 -100	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{\text{mg Chl.} * \text{h}}$
Dunkelrespiration:	0,5 - 4	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{10^6 \text{ Protoplasten} * \text{h}}$
	6 - 20	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{\text{mg Chl.} * \text{h}}$
Durchmesser:	24 - 47	µm
Dichte:	1,040 - 1,056 g/ml in Saccharose/Sorbit	

3.1.1.2. Nicotiana tabacum

Ausbeute:	0,5 - 2,5 * 10^6	$\frac{\text{Protoplasten}}{\text{g FG}}$
Chlorophyllgehalt:	0,1 - 0,5	$\frac{\text{mg Chl.}}{10^6 \text{ Protoplasten}}$
O_2-Entwicklung:	16 - 28	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{10^6 \text{ Protoplasten} * \text{h}}$
	49 - 65	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{\text{mg Chl.} * \text{h}}$
Dunkelrespiration:	1,5 - 2,5	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{10^6 \text{ Protoplasten} * \text{h}}$
	4 - 7	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{\text{mg Chl.} * \text{h}}$
Durchmesser:	35 - 60	µm

Spezifische Dichte: 1,046 - 1,067 g/ml in Sacch./Sorbit

3.1.1.3. Vicia faba

Ausbeute:	2 - 6 * 10^6	$\frac{\text{Protoplasten}}{\text{g FG}}$	
Chlorophyllgehalt:	0,1 - 0,2	$\frac{\text{mg Chl}}{10^6 \text{ Protoplasten}}$	
O_2-Entwicklung:	6 - 12	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{10^6 \text{ Protoplasten} * \text{h}}$	
	30 - 70	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{\text{mg Chl.} * \text{h}}$	
Dunkelrespiration:	0,4 - 1,2	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{10^6 \text{ Protoplasten} * \text{h}}$	
	3 - 6	$\frac{\mu\text{mol } O_2}{\text{mg Chl.} * \text{h}}$	
Durchmesser:	32 - 48	µm	
Dichte:	1,045 - 1,065	g/ml in Saccharose/ Sorbit	

3.1.2. Evakuolisierung der Mesophyllprotoplasten

Die von Griesbach und Sink (1983) entwickelte Methode zur Evakuolisierung von Petunia-Protoplasten ließ sich erfolgreich auf Hafer, Tabak und Saubohne übertragen.

Bedingt durch die Heterogenität der Ausgangsprotoplasten kam es bei der Herstellung vakuolenfreier Protoplasten ebenfalls zu Schwankungen bezüglich Trennung, Ausbeute, Vitalität und Haltbarkeit. Dagegen traten artspezifische Unterschiede zurück, so daß im Folgenden für alle drei Arten gemeinsame Werte angegeben wurden.

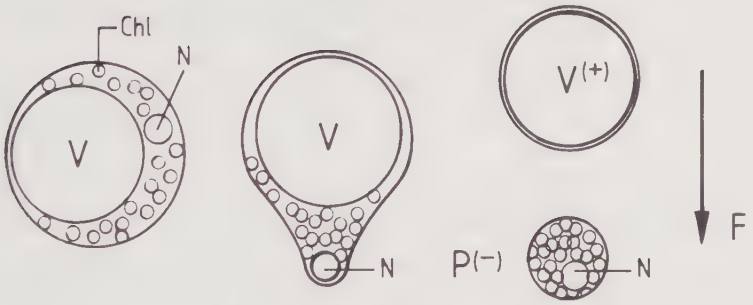


Abb. 18: Fragmentation des Protoplasten während der Zentrifugation. (nach Lörz, 1984, verändert)
V, Vakuole
N, Kern
Chl, Chloroplasten
V(+), Pseudovakuole (Vakuole mit Plasmalemma)
P(-), Evakuolisierter Protoplast, Miniprotoplast
F, Zentrifugalkraft

3.1.2.1. Evakuolisierte Protoplasten

Ausbeute: 30 - 40 % der eingesetzten Mesophyll-protoplasten

Chlorophyllgehalt: ca. 100 % der Ausgangsprotoplasten

O_2-Entwicklung: 8 - 20 $\frac{\mu mol\ O_2}{mg\ Chl. * h}$

das entspricht etwa 1/3 der Ausgangsprotoplasten

Dunkelrespiration: 1 - 3 $\frac{\mu mol\ O_2}{mg\ Chl. * h}$

1/7 - 1/10 der Photosyntheserate

Durchmesser: 16 - 26 µm

Spezifische Dichte: 1,10 - 1,12 g/ml in Percoll-Sorbit-Lösung

Eigene Messungen verglichen mit den Untersuchungen von Steingraber (1985) für Hafer, und Naton (1986) für Tabak, ergaben für die evakuolisierten Protoplasten folgendes Bild:

- der Durchmesser beträgt wenig mehr als die Hälfte der Ausgangsprotoplasten,

- das Volumen ist um ca. 80 % reduziert,

- das Plasmalemma ist intakt (Nachweis mit FDA und Ausschlußfarbstoffen)

- alle Miniprotoplasten besitzen einen Kern (durch Fluoreszenzfärbung mit DAPI und Bisbenzimid nachgewiesen),

- die Anzahl der Chloroplasten und Mitochondrien ist nur geringfügig gegenüber den Ausgangsprotoplasten vermindert (Markerenzymbestimmungen),

- die Vakuole ist vollständig entfernt, (Saure Phosphatase-Bestimmung),

- 2/3 des Cytoplasmas gehen während der Evakuolisierung verloren, (PEP-Carboxylase-Aktivität),

- infolge der hohen Ca-Konzentration im Percollpuffer kommt es bei 0,5 - 1 % der Protoplasten zu Spontanfusionen,

- Miniprotoplasten sedimentieren in 0,5 M Saccharose während die Ausgangsprotoplasten in einer gleichmolaren 1 : 1-Lösung aus Sorbit und Saccharose flottieren. Dadurch ist eine Trennung der beiden Protoplastentypen in einem isoosmotischen Dichtegradienten möglich.

3.1.3. Vakuolen und Pseudovakuolen

Eine sequentielle Untersuchung des Percollgradienten ergab, daß sich im obersten Drittel und besonders unmittelbar unter der Oberfläche reine Vakuolen befanden, während die gut sichtbare Bande über dem Bruch überwiegend aus Vakuolen gebildet wurde, die zusätzlich eine Plasmamembran besitzen. (Pseudovakuolen, V (+))

Diese lichtmikroskopischen Betrachtungen wurden durch Färbungen mit Neutralrot, FDA, und einer Messung der Membrandurchbruchspannung ergänzt.

Ausbeute: 10 - 30 % der eingesetzten Protoplasten

Durchmesser: 24 - 45 µm, entspricht etwa 90 % des Protoplastendurchmessers

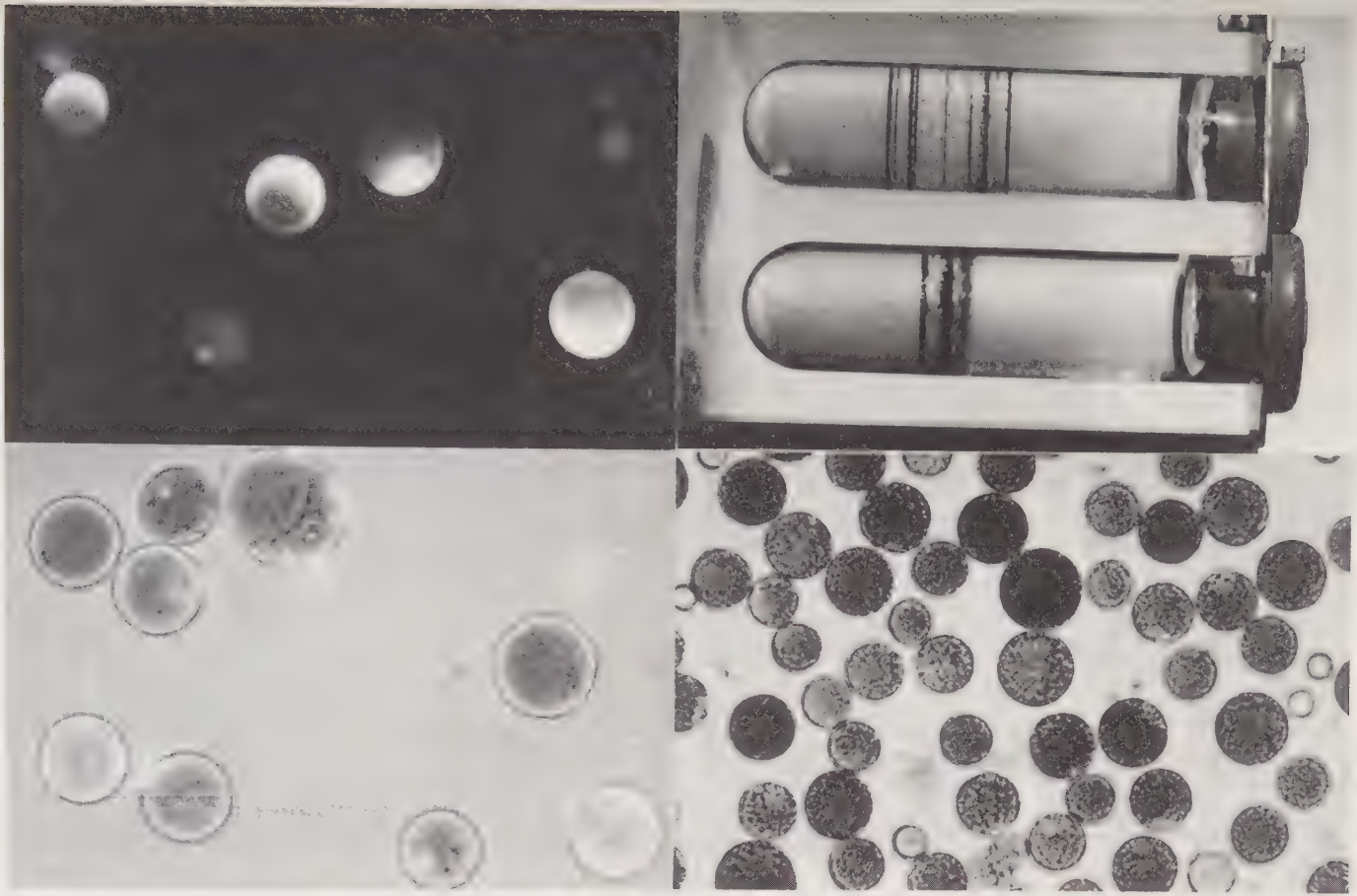
Spezifische Dichte: 1,04 - 1,05 g/ml in Percoll/Sorbit

Abb. 19: Percollgradient (b); zur besseren Darstellung wurden die Haferprotoplasten vor der Zentrifugation mit Neutralrot angefärbt. Die Dichtebestimmung erfolgte mit Markerbeads (a)

Abb. 20: Evakuolisierte Hafer-Mesophyllprotoplasten (500-fach)

Abb. 21: Pseudovakuolen mit FDA und Neutralrot gefärbt. Ein fluoreszierender Plasmaring umgibt die rotgefärbte Vakuole.

Abb. 22: Pseudovakuolen mit Neutralrot angefärbt. Neutralrot ist ein Vitalfarbstoff, der in der Vakuole akkumuliert wird. Die Fraktion ist durch Zytoplasmareste verunreinigt. Phasenkontrast (500-fach)



3.2. Protoplasten im elektrischen Wechselfeld

3.2.1. Dielektrophoretische Kraft

Die Kraft, die eine dielektrische Kugel in einem elektrischen Feld erfährt, ergibt sich nach Pohl (1978) aus folgender Gleichung:

Gleichung 1:

$$\vec{F} = 2 * \pi * r^3 * \varepsilon_o * \varepsilon_1 \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_1}{\varepsilon_2 + 2\varepsilon_1} \nabla|\vec{E}|^2$$

$\vec{F}$: Kraft auf ein Teilchen
r : Radius des Teilchens
$\vec{E}$: Feldstärke
∇ : Vektor für den Feldgradienten
ε_0 : Dielektrizitätskonstante Vakuum
ε_1 : Dielektrizitätskonstante Medium
ε_2 : Dielektrizitätskonstante Teilchen

Bei sonst gleichen Bedingungen ist $F \sim r^3 * E^2$.

Bei der Bildung von Ketten muß die Kraft F gerade so groß sein, daß sie die Brown'sche Molekularbewegung aufhebt, also k * T. Da dies für eine bestimmte Temperatur konstant ist, gilt $E^2 \sim \frac{1}{r^3}$ oder $E \sim R^{-1,5}$. (Schwan und Sher 1969)

Je kleiner die Partikel, desto größer muß die elektrische Feldstärke sein, damit diese dielektrophoretisch gesammelt werden können.

Diese quantitative Abschätzung wurde mit Bakterien, Chloroplasten und Protoplasten experimentell überprüft. Chloroplasten wurden durch mechanische Zerstörung der Protoplasten gewonnen. Die beweglichen Pseudomonaden wurden abgetötet. Nicht abgetötete lagerten sich wegen ihrer Eigenbewegung nicht zu Ketten zusammen, sondern bewegten sich längs der Feldlinien.

Die Teilchen wurden in Fusionsmedium suspendiert. In einer Plattenkammer (d = 0,5 mm) wurde bei einer Frequenz von 1 MHz die minimale Sammelspannung U bestimmt und das Schwellenpotential $E_{th} = \frac{U}{d}$ berechnet.

In Abb. 23 ist E_{th}^{-2} gegen r^3 aufgetragen. Daraus ist die Proportionalität eindeutig erkennbar.

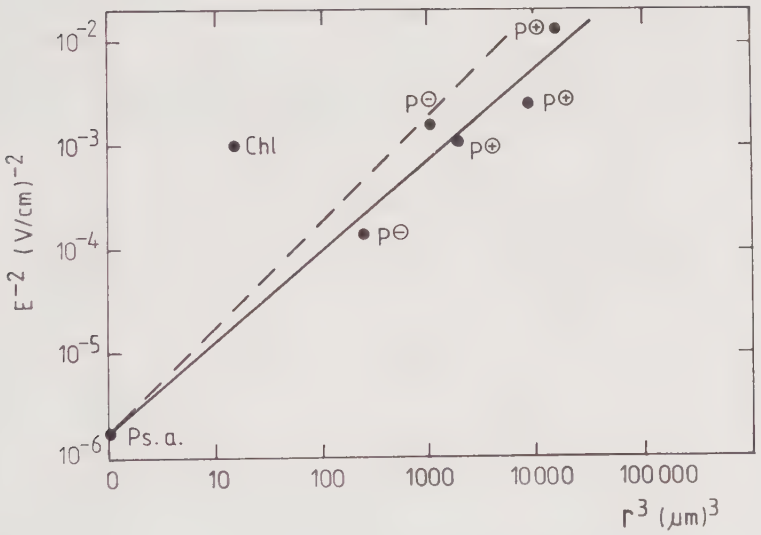


Abb. 23: Schwellenfeldstärke in Abhängigkeit von der Partikelgröße

Die Meßwerte von Bakterien (Ps. a.), evakuolisierten Protoplasten (P(-)) und normalen Hafermesophyllprotoplasten (P(+)) liegen auf einer Geraden, die nur wenig von der direkten Proportionalität verschieden ist (- - -). Auffallend ist die Abweichung des Meßwertes bei den Chloroplasten (Chl.). Die Ursache hierfür könnte auf die spezielle Chloroplastenstruktur und die sich daraus ergebenden anderen dielektrophoretischen Eigenschaften zurückzuführen sein.

Eine exakte Bestimmung des Schwellenwertes ist unter anderem deshalb unmöglich, weil die Anzahl der gebildeten Ketten auch von der Sammelzeit abhängt. Dies wurde mit Protoplasten gezeigt. Bei unterschiedlichen Feldstärken wurde die Zeit zwischen Einschalten der Sammelspannung (f = 1 MHz) und Anlagerung von mindestens drei Protoplasten in Feldrichtung bestimmt (Abb. 24). Die Kurve ist eine Funktion höherer Ordnung. Außerdem gilt auch hier, daß die Feldstärke umgekehrt proportional zur Sammelzeit ist. Eine weitere Analyse der Meßwerte zeigte, daß der Regressionskoeffizient 0,87 beträgt. Damit wird die Beziehung $t \sim E^{-2}$ - theoretisch gefordert - ganz gut erfüllt.

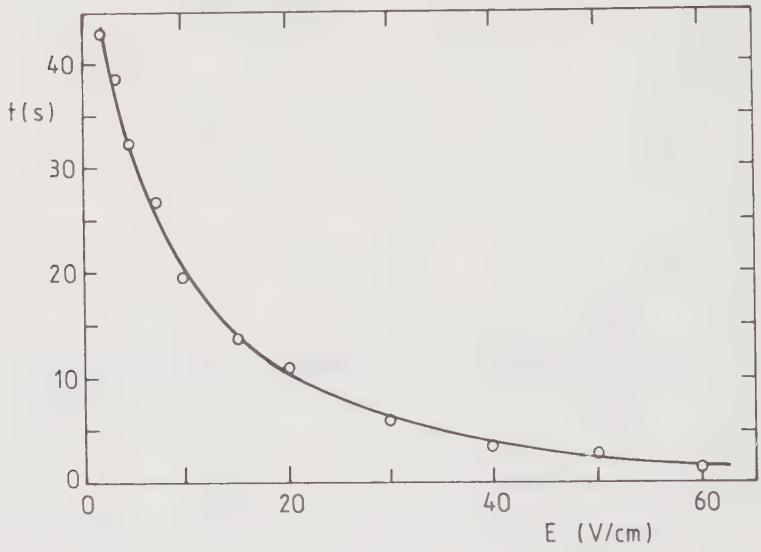


Abb. 24: Sammelzeit t der Protoplasten in Abhängigkeit von der Feldstärke E

Eine anschauliche Erklärung für dieses Ergebnis liefert die Betrachtung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung, welche ja für die Kettenbildung verantwortlich ist. Diese Kräfte nehmen mit dem Quadrat der Entfernung ab und damit die Zeit zu, welche nötig ist, um Protoplasten in den Anziehungsbereich zu bringen. Dadurch wird klar, daß die Suspensionsdichte ebenfalls miteingeht. Deshalb wurden alle Messungen bei gleicher Protoplastendichte gemacht.

3.2.2. Frequenzabhängigkeit

Es gibt für Zellen viele mögliche Polarisierungsmechanismen und alle haben einen charakteristischen Frequenzbereich (Pohl 1978). Die Kraft F ist proportional der Polarisierung p eines Teilchens. Damit ergibt sich eine Frequenzabhängigkeit der Sammelspannung. Diese wurde für normale und evakuolisierte Protoplasten bestimmt (Abb. 25).

Protoplasten wurden in Fusionsmedium suspendiert und in eine Plattenkammer (d = 0,5 mm) gefüllt. Im Frequenzbereich von 7 kHz - 7 MHz wurde die Schwellenspannung bestimmt, indem die Spannung, bei 0 V beginnend, langsam erhöht wurde, bis eine Anlagerung der Protoplasten zu beobachten war.

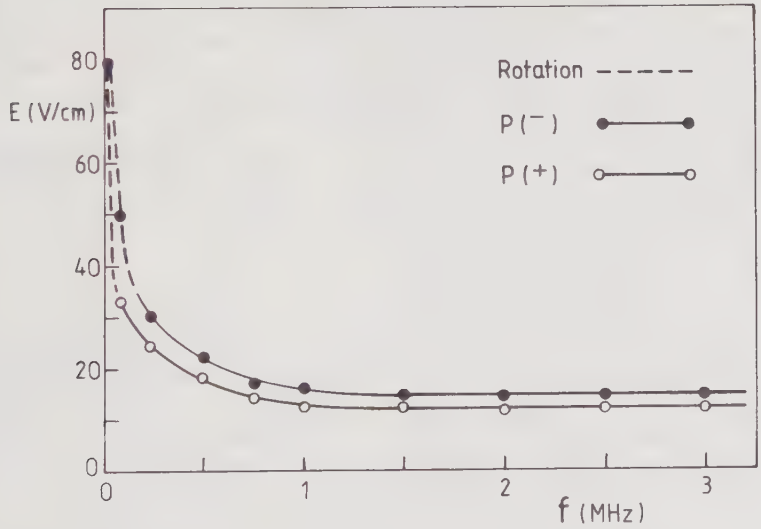


Abb. 25: Sammelfeldstärke E als Funktion der Frequenz f
Die Kurve läßt sich in drei Bereiche gliedern:
- 7 MHz - 500 kHz konstanter Schwellenwert
- 500 kHz - 50 kHz Zunahme des Schwellenwertes, die spezifische Polarisation der Protoplasten nimmt ab
- 50 kHz - 7 kHz (500 kHz) Rotation der Zellen bei hoher Sammelspannung, eine Anlagerung in Feldrichtung kommt nicht mehr zustande.

3.2.3. Darstellung von Mikrofeldern

Eine Suspension aus toten Bakterien und Protoplasten wurde in die Drahtkammer gefüllt und die Sammelspannung (1 MHz) langsam erhöht.

Wie erwartet sammelten sich zuerst die Protoplasten (Abb. 26) Bei steigender Spannung konzentrierten sich die Bakterien an den Drahtelektroden und an den Polen der Protoplasten (Abb. 27). Das sind also die Orte höchster Feldstärke. In Abb. 28 wurde die Sammelspannung so weit erhöht, daß die Protoplasten kurz vor dem Zerreißen waren. Die Bakterienketten machten jetzt den Feldlinienverlauf in der Kammer und zwischen den Protoplasten deutlich sichtbar. Die Feldlinien verlaufen also von den Elektroden zu den an der Membran influenzierten Ladungen und endigen dort. Der Raum um den Protoplasten ist nahezu feldfrei. Erst wieder in einigem Abstand verlaufen Feldlinien zwischen den Elektroden (Abb. 29).

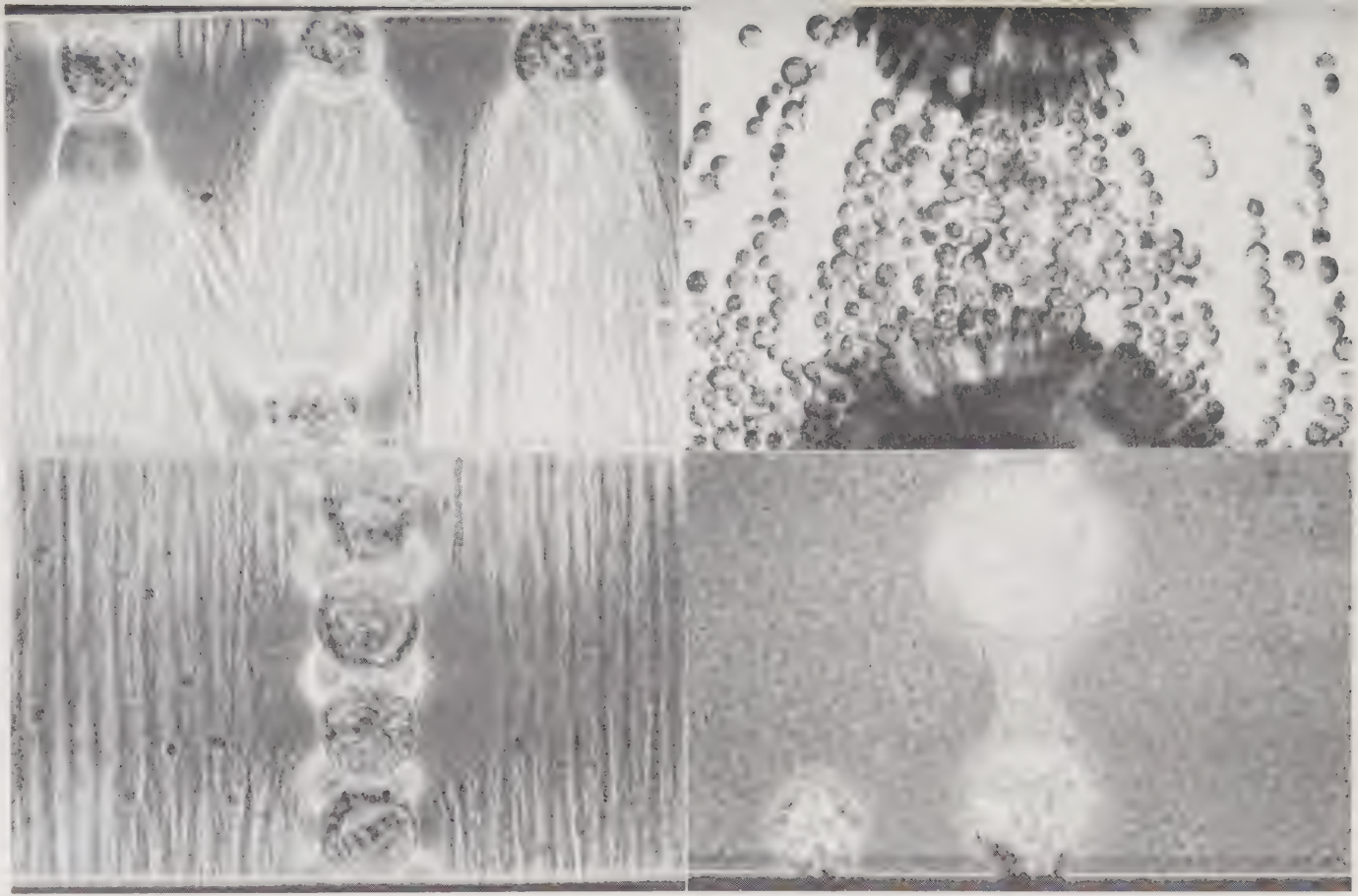
Abb. 26: Haferprotoplasten im Feld zwischen zwei senkrecht gestellten Drahtelektroden Ø 200 µm, im Abstand von 200 µm. Die Protoplasten sind dem Feldlinienverlauf entsprechend angeordnet.

Abb. 27: Tabakprotoplasten in der Drahtkammer. Bei einer Feldstärke von 100 V/cm sammeln sich die Bakterien an den Zellpolen.

Abb. 28: Sammelfeldstärke 375 V/cm. Durch die hohe Feldstärke werden die Protoplasten deformiert. Der Feldlinienverlauf zwischen den Protoplasten wird durch die Bakterien deutlich sichtbar.

Abb. 29: Die Bakterien bilden geschlossene Feldlinien zwischen den Protoplasten. Sie beginnen und endigen an den Zellpolen.

Alle Aufnahmen mit Bakterien erfolgten im Phasenkontrast.



Fusionskammern mit aufgedampften Elektroden haben zu deren Kanten hin ein stark inhomogenes Feld. Versuche mit Plattenkammern zeigten ein ähnliches Bild, bis auf den Unterschied, daß weder Protoplasten noch Bakterien an die Elektroden gezogen wurden. Die Ketten bildeten sich im Raum zwischen den Elektroden. Daraus folgt, daß die Protoplasten durch ihre Anwesenheit das primär homogene Feld der Plattenkammer verzerren. Sie bilden Felddichtegradienten und wandern dadurch aufeinander zu, in Richtung höherer Feldstärke. Diesen Effekt bezeichnet man als positive Dielektrophorese. Näherten sich dabei zwei oder mehrere Protoplasten, so bewegten sie sich schneller aufeinander zu und ordneten sich in Form von Ketten perlschnurartig entlang der Feldlinien an.

In der Draht- oder Mäanderkammer bildeten sich diese Ketten durch die hohen lokalen Feldstärken an den Elektroden. Je größer der Drahtdurchmesser und der Abstand der Drähte, umso weniger stark wurden die Zellen zu den Elektroden gezogen. Nach Abschalten des Feldes verteilten sich die Zellen auf Grund der Brown'schen Bewegung.

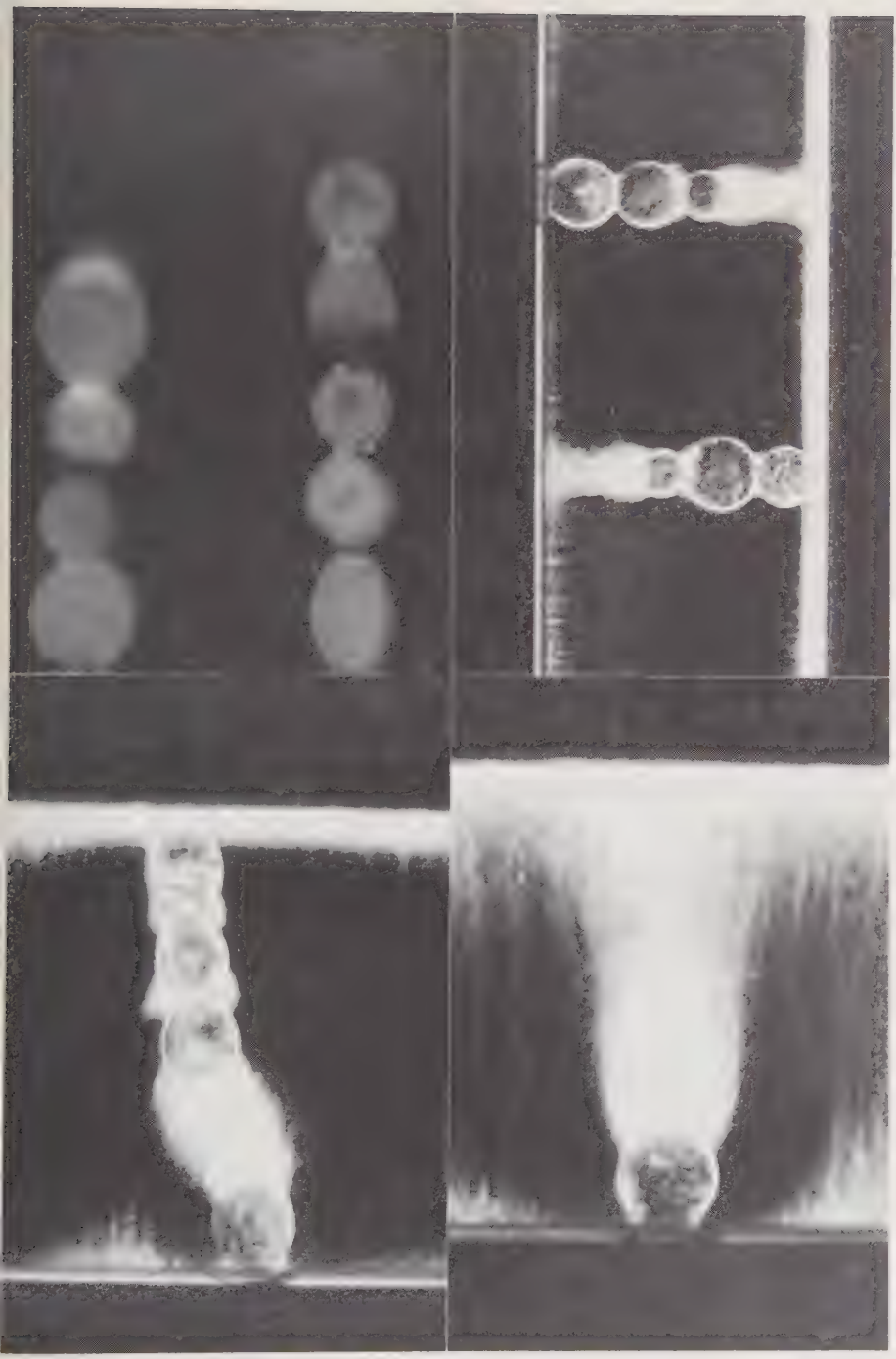
Ein zweiter Versuch zur Feldanalyse, bei dem statt Bakterien Glas- oder Polystyrolkügelchen verwendet wurden, brachte überraschenderweise einen interessanten Effekt zu Tage:

Abb. 30: Fluoreszenzlichtaufnahme; Protoplasten im elektrischen Feld der Drahtkammer. (E = 50 V/cm). Zur Feindarstellung der Feldlinien wurden die Bakterien mit Berberin gefärbt. Sie fluoreszieren gelb. Die Protoplasten zeigen rote Chlorophyllfluoreszenz.

Abb. 31: Dunkelfeldaufnahme; die durch die Bakterien dargestellten Feldlinien erscheinen weiß.

Abb. 32: Feldlinien können auch schräg verlaufen. Sie nehmen den kürzesten Weg zwischen zwei Ladungen.

Abb. 33: Um einen Protoplasten bildet sich ein feldfreier Raum, da alle Feldlinien über die Polarisationsladungen am Protoplasten laufen.



Die Polystyrolkügelchen, die zu Beginn gleichmäßig verteilt waren, bildeten beim Anlegen der Wechselspannung Ketten, welche aber langsam aus dem Feld heraus hinter die Elektroden wanderten (Abb. 34). Die wenigen verbleibenden Kügelchen sammelten sich an der "Äquatorzone" der Protoplasten. Sie wanderten also in die Bereiche geringster Feldstärke und zeigten diese dadurch an (Abb. 35). Dieses Phänomen ist als negative Dielektrophorese bekannt. Die Ursache hierfür ist darin zu sehen, daß die Richtung der Kraft von der Differenz der Dielektrizitätskonstanten Partikel/Medium abhängt (Gleichung 1). Stark polarisierbare Teilchen, das heißt mit großer Dielektrizitätskonstante, werden auf Grund der Dielektrophorese in Regionen hoher Feldstärke, also an den Zellpolen, gesammelt. Schwach polarisierbare Teilchen, deren Volumenplarisierbarkeit kleiner ist als die des Mediums, werden dagegen aus diesen Gebieten vertrieben, da die umgebende Flüssigkeit stärker angezogen wird (Schwan und Sher 1969).

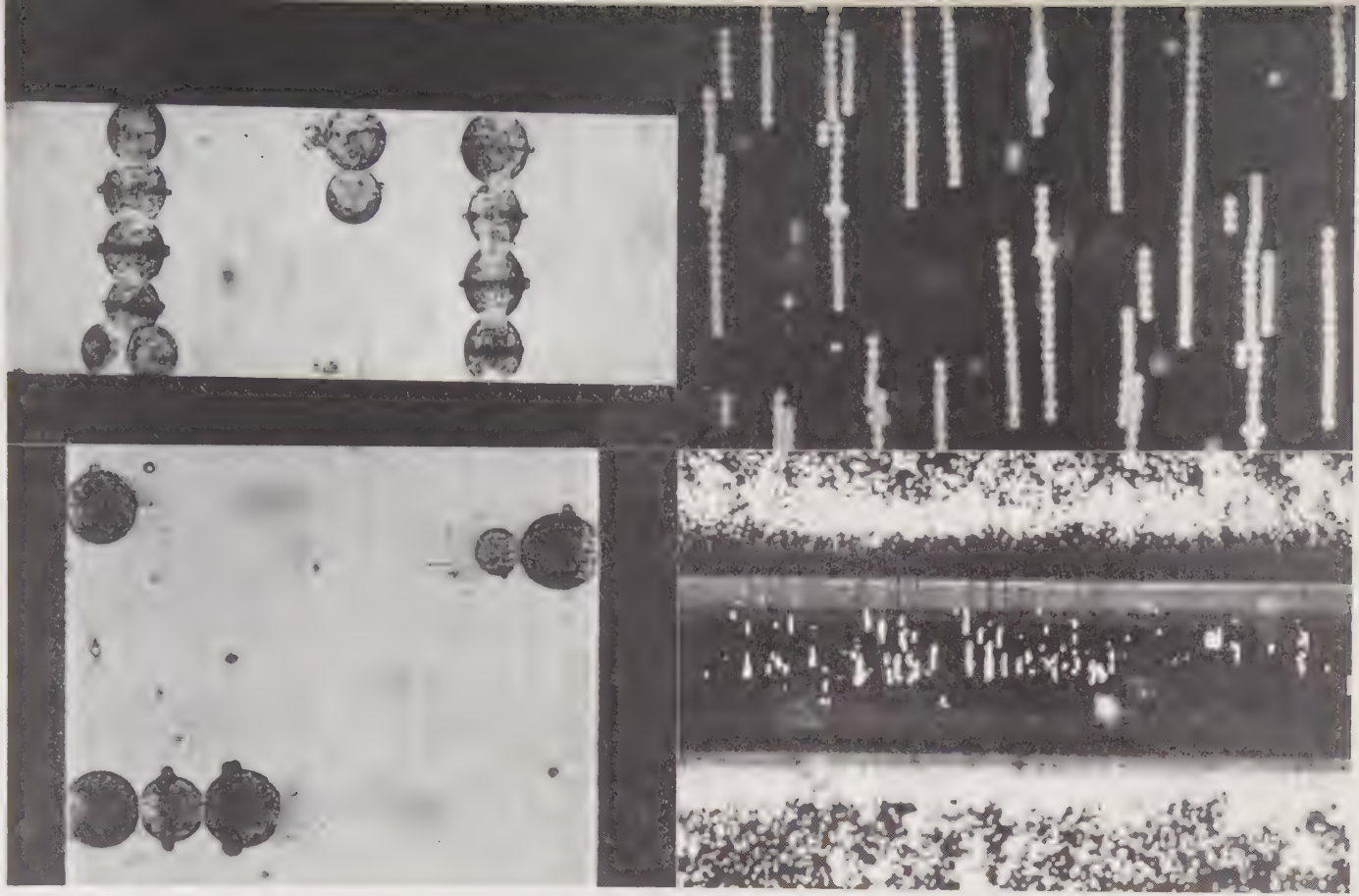
Da die Dielektrizitätskonstante eine Funktion der Frequenz ist, kann sich dieses Verhalten ändern. Im untersuchten Frequenzbereich zwischen 7 kHz und 7 MHz zeigten die Glas- und Polystyrolkügelchen negative Dielektrophorese, während bei Protoplasten und Bakterien positive Dielektrophorese zu beobachten war.

Abb. 34: Die fluoreszierenden Polystyrolkügelchen bilden Ketten in Feldrichtung. Diese werden jedoch nicht an die Draht-Elektroden gezogen, sondern sammeln sich in der Mitte zwischen den Elektroden.

Abb. 35: Dunkelfeldbeleuchtung; die Polystyrolkügelchen erscheinen weiß. Nur bei hoher Suspensionsdichte verbleiben einige Kügelchen im Elektrodenraum. Die meisten streben dem feldfreien Raum außerhalb der Elektroden zu.

Abb. 36: Lokalisation der verbleibenden Kügelchen im Äquatorbereich (Separatrix) der Protoplasten.

Abb. 38: Evakuolisierte Protoplasten mit Polystyrolkügelchen und Bakterien



3.2.4. Diskussion

Das Verhalten von Zellen im elektrischen Wechselfeld wird durch ihre elektrischen Eigenschaften bestimmt. Diese ergeben sich aus ihrer Leitfähigkeit K und der Dielektrizitätskonstante ε. Beide sind eine Funktion der Frequenz (Zimmermann 1982).

Optimale dielektrophoretische Sammlung normaler Protoplasten ist bei Frequenzen ab 1 MHz gegeben. Evakuolisierte Protoplasten benötigen, da sie kleiner sind, eine etwas höhere Sammelspannung, außerdem wurde in einzelnen Fällen bei 500 kHz Rotation beobachtet.

Die Bildung von Ketten ist durch zwei Größen charakterisiert: die Zeitkonstante und das Schwellenpotential. Die Zeitkonstante der Kettenbildung wurde ausführlich von Saito und Schwan (1961) und Sher et al. (1970) diskutiert und scheint proportional E^{-2} zu sein. Die Abhängigkeit des Schwellenpotentials von der Partikelgröße bestimmten Takashima und Schwan (1985) mit Siliconpartikeln zu $E_{th} \sim r^{-1,5}$.

In dieser Arbeit wurde mit Bakterien, Chloroplasten und verschiedenen Protoplasten gezeigt, daß dies auch für biologische Systeme gilt. Abweichungen sind durch die subjektive Einschätzung des Sammelzeitpunktes und die gegenseitige Beeinflussung von Schwellenpotential und Sammelzeit zu erklären. Der abweichende Wert, der für Chloroplasten ermittelt wurde, läßt auf andersartige dielektrophoretische Eigenschaften schließen. Dies hängt sicherlich mit der Membranstruktur der Chloroplasten zusammen.

Der Dielektrophorese-Koeffizient α ist proportional dem Zellvolumen. Der Proportionalitätsfaktor ist p und charakterisiert die Polarisation und Konduktivität des Zellmaterials. Hohe spezifische Polarisation führt zu engem Zellkontakt.

Stoicheva und Dimitrov (1986) bestimmten den Dielektrophorese-Koeffizient $\propto$ für Erbsen-Protoplasten als $16*10^{-24} \frac{A^2 * s^4}{kg}$ und den für Chloroplasten als $0{,}16*10^{-24} \frac{A^2 * s^4}{kg}$.

Mit den durchschnittlichen Radien für Hafer-Protoplasten von 20 µm und Chloroplasten von 2,5 µm errechnen sich damit spezifische Polarisationsfaktoren von $4{,}8*10^{-10} \frac{A^2 * s^2}{kg * m^3}$ für Protoplasten und $2{,}5*10^{-9} \frac{A^2 * s^4}{kg * m^3}$ für Chloroplasten. Damit ergibt sich für Chloroplasten eine um den Faktor 10 größere Polarisierbarkeit, was hier durch eine entsprechend geringere Schwellenspannung zum Ausdruck kommt.

Die im untersuchten Frequenzbereich (KHz) stark polarisierbaren Teilchen wie Protoplasten, Chloroplasten und Bakterien sammeln sich auf Grund der Dielektrophorese in Regionen hoher Feldstärke, also in der Nähe der Elektroden und anderer Zellen. Schwach polarisierbare Teilchen wie Polystyrol- und Glaskügelchen werden aus diesen Bereichen verdrängt. Zwar bilden auch diese auf Grund der elektrostatischen Anziehung ihrer Polarisationsladungen Ketten in Feldrichtung, jedoch wandern sie nicht an die Elektroden oder an die Pole anderer Zellen, da diese die gleiche Polarität besitzen, wie die zugewandte Partikelseite, also abstoßend wirken. Diese Eigenschaften wurden für die Darstellung von Mikrofeldern ausgenützt. Für die Sammlung von Protoplasten in einer Fusionskammer läßt sich daraus folgendes ableiten:

Ein homogenes Feld ist im Bereich der Protoplasten stark inhomogen. Durch ihre Anwesenheit verzerren sie das elektrische Feld, das heißt, sie bilden Feldgradienten und wandern dadurch aufeinander zu. Nähern sich dabei zwei oder mehrere Protoplasten, so beeinflussen sie sich auf Grund ihrer Dipolmomente gegenseitig und ordnen sich in Form von Ketten aus zwei, drei oder mehr Zellen an.

Aus der Kenntnis der Schwellenspannung für verschiedene Partikel ist es sogar möglich, qualitative Abschätzungen über lokale Feldstärken aus dem Feldlinienbild zu erhalten.

Die Schwellenfeldstärke für Protoplasten liegt bei 20 $\frac{V}{cm}$, für Bakterien bei 500 $\frac{V}{cm}$. Die ersten Bakterien sammelten sich aber bereits bei einer angelegten Feldstärke von 70 $\frac{V}{cm}$ an den Polen der Protoplasten. Das heißt, die Feldstärke ist dort etwa siebenmal größer als im ursprünglich homogenen Feld. Am Äquatorbereich (Separatrix) der Protoplasten enden selbst bei hoher Sammelspannung keine Feldlinien. Die lokale Feldstärke ist dort gleich Null. Dieser Membranbereich wird nicht polarisiert.

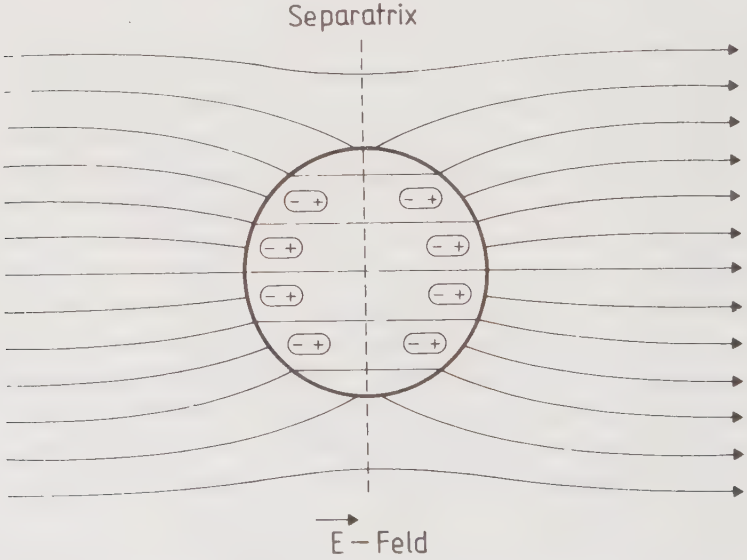


Abb. 38: Schematisch dargestellter Feldlinienverlauf in der Umgebung eines Protoplasten im ursprünglich homogenen elektrischen Feld.

Betrachtet man den Protoplast als dielektrische Kugel, so verursachen die Polarisationsoberflächenladungen eine Verringerung des Feldes im Zellinnern gegenüber dem Außenfeld.
Die Separatrix trennt ankommende und abgehende Feldlinien.

3.3. Elektrischer Durchbruch

Die Elektrofusion beruht auf dem reversiblen elektrischen Durchbruch der Membranen dielektrophoretisch gesammelter Zellen durch einen kurzen Gleichstrompuls hoher Intensität. Die dadurch induzierte Membranspannung U_i ergibt sich für sphärische Zellen aus Gleichung (2) (Jeltsch und Zimmermann 1979)

Gleichung 2:

$$U_i = \frac{1{,}5 \cdot r \cdot E \cdot \cos \vartheta}{\left[1 + (\omega\tau)^2\right] 1/2}$$

r = Radius der Zelle
E = Feldstärke
ϑ = Winkel zwischen einem gegebenen Punkt P auf der Zelloberfläche und der Feldrichtung
$\omega = 2\pi f$, Kreisfrequenz
τ = Relaxationszeit

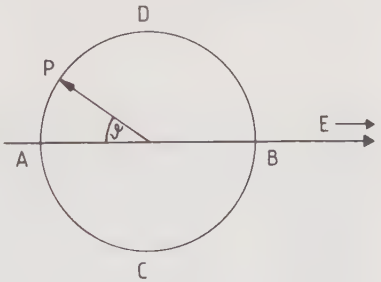


Abb. 39: Schematische Darstellung einer Zelle im homogenen Feld. Die Spannung über der Membran an einem Punkt P ist durch Gleichung 2 gegeben.

Für den stationären Fall $\omega\tau \ll 1$ wird der Ausdruck im Nenner zu 1.

Wie auch aus den Feldlinienbildern (Abb. 35 - 37) hervorgeht, hat das äußere Feld an den Punkten C und D keinen Einfluß auf die Membran ($\cos \vartheta = 0$). An den Polen der Protoplasten (A, B) in Feldrichtung ist das induzierte Membranpotential am größten beziehungsweise tritt der Durchbruch zuerst ein ($\cos \vartheta = \pm 1$). Dies ist aber auch die Kontaktzone zur Nachbarzelle.

Es ist also möglich, über die Fusion die Durchbruchspannung der Membran abzuschätzen.

3.3.1. Bestimmung der Membranfusionsspannung

Diese Versuche wurden mit Avena-Mesophyllprotoplasten, Miniprotoplasten und Pseudovakuolen durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen in einer Fusionskammer gesammelt, von zwei gleich großen Nachbarzellen der Durchmesser bestimmt, und die Intensität des Pulses (20 µs) in 1 V-Schritten gesteigert, bis Fusion beobachtet wurde. Aus der ermittelten Fusionsspannung und den gemessenen Zellradien wurde über Gleichung 2 die Membrandurchbruchspannung errechnet. Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 2: Aus der Fusion ermittelte Membrandurchbruchspannungen

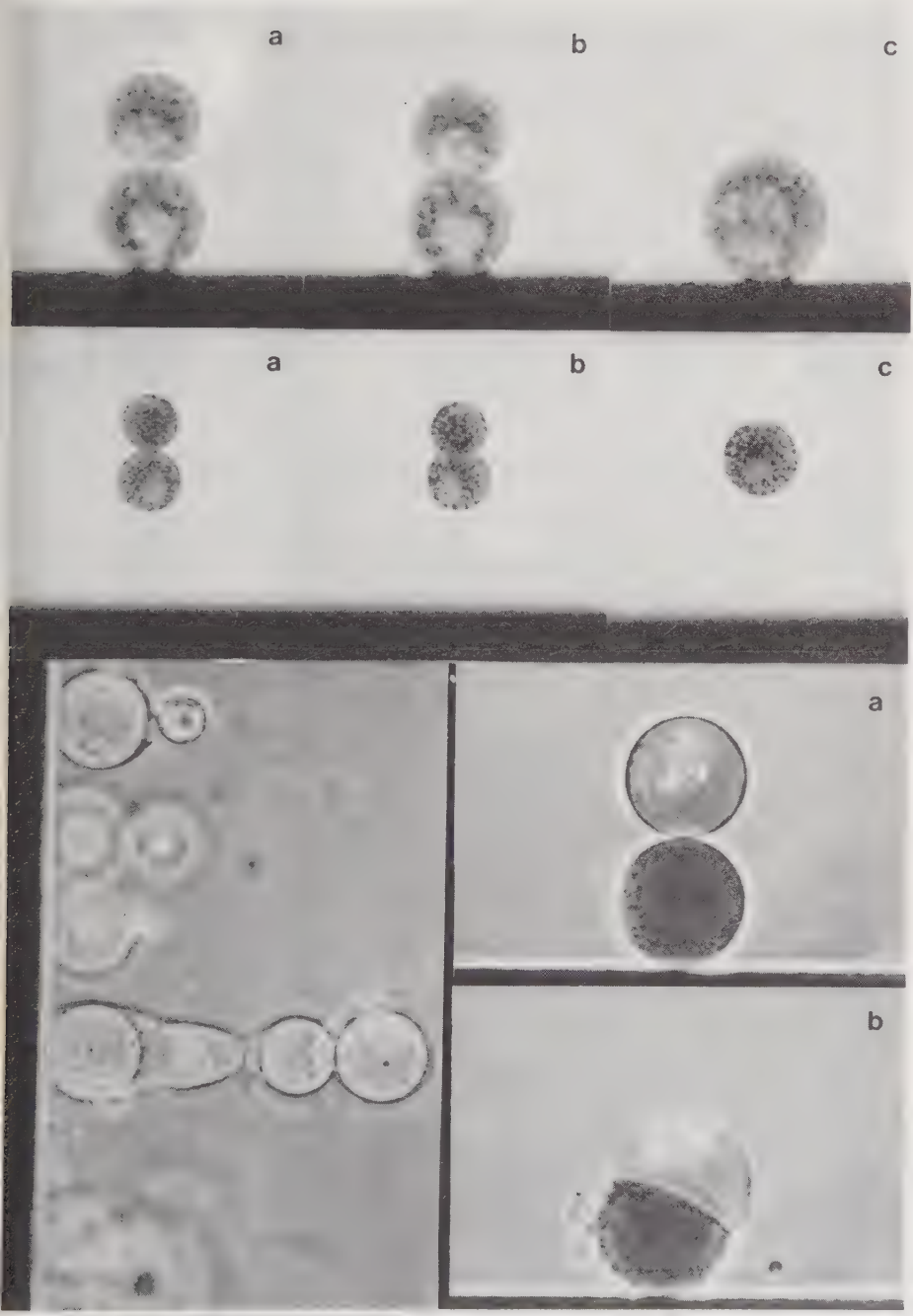
	Protoplastentyp	U_m
Avena	Mesophyllprotoplasten	2,2 V
Tabak	Mesophyllprotoplasten	2,4 V
Avena	Miniprotoplasten	1,4 V
Tabak	Miniprotoplasten	1,7 V
Avena	Pseudokavuolen	2,1 V
Tabak	Pseudovakuolen	2,1 V
Avena	Vakuolen	1,1 V

Abb. 40: Kinetik der Fusion von Avena Protoplasten. a) Sammlung (50 V/cm, 1 MHz), b) Fusion (700 V/cm, 20 µs), c) abgerundete Zelle 2 min. nach Pulsgabe

Abb. 41: Kinetik der Fusion evakuolisierter Tabakprotoplasten. a) Sammlung (50 V/cm, 1 MHz), b) Fusion (1500 V/cm, 50 µs) c) Fusionsprodukt 10 min. nach Puls

Abb. 42: Fusion von Pseudovakuolen aus Haferprotoplasten. (Puls 700 V/cm, 20 µs). Im Phasenkontrast sind beide Membranen sichtbar.

Abb. 43: Fusion von Vakuolen aus Haferprotplasten, mit Neutralrot gefärbt. a) Sammlung im Wechselfeld (70 V/cm, 1 MHz) b) Die Fusion wurde durch einen elektrischen Feldpuls der Intensität 400 V/cm und 20 µs Dauer ausgelöst.


a
b
c
a
b
c
a
b

Gleichzeitig zeigte sich, daß für größere Protoplasten kleinere Feldstärken für die Fusion nötig waren als für kleinere Protoplastenpaare. Diese Radiusabhängigkeit ist in Abb. 44 dargestellt. Sie geht auch aus der Gleichung 2 hervor.

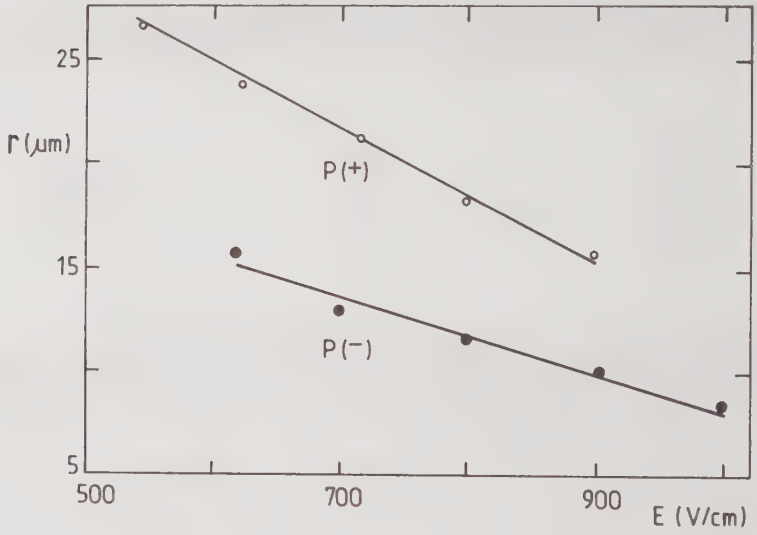


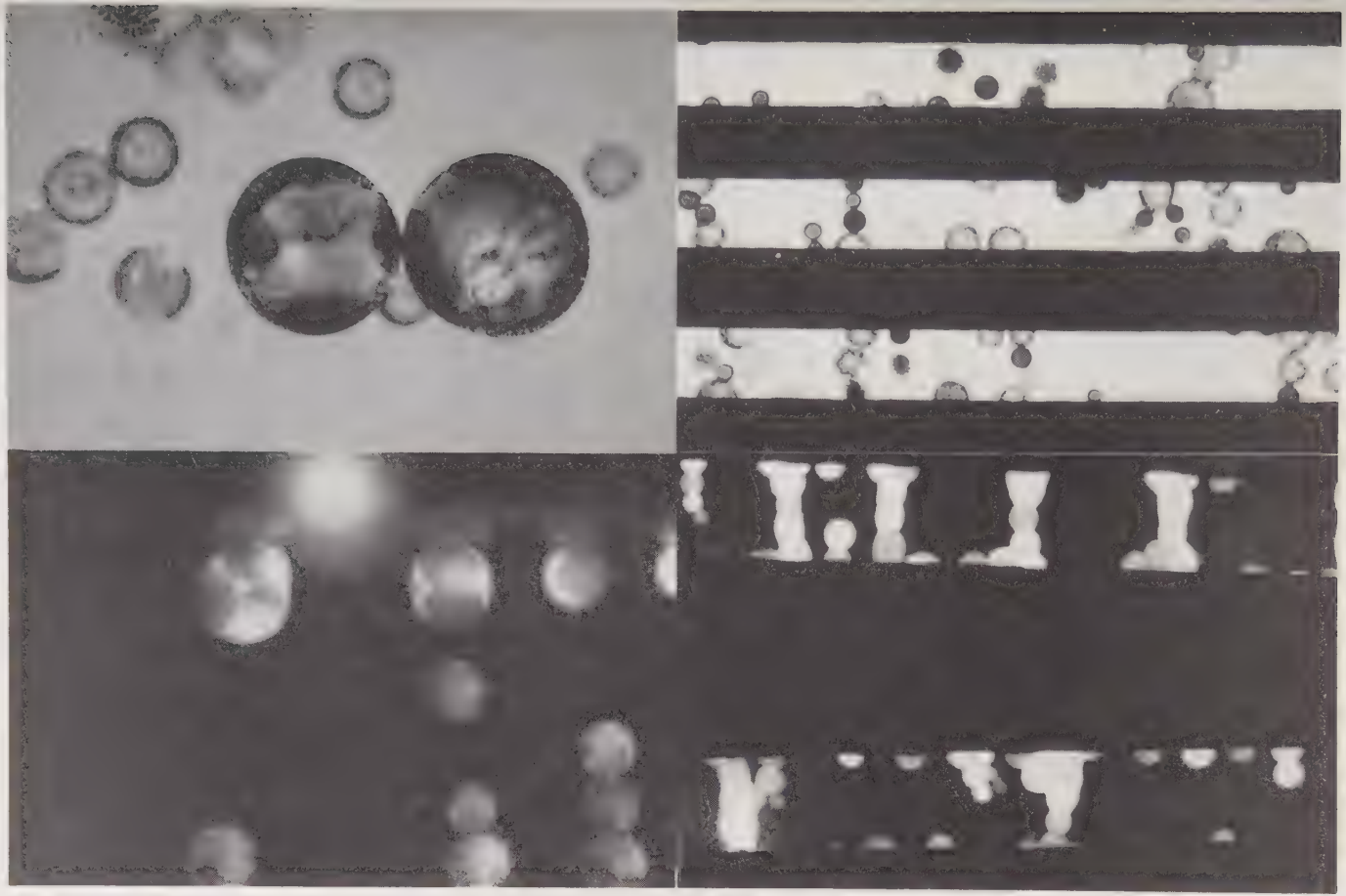
Abb. 44: Für die Fusion nötige Feldstärke in Abhängigkeit vom Radius der Hafer-Protoplasten. Die Bestimmung erfolgte über die Fusion zweier gleichgroßer Protoplasten. P (+): Mesophyllprotoplasten, P (-): evakuolisierte Protoplasten)

Abb. 45: Fusion evakuolisierter und normaler Tabakprotoplasten in der Mäanderkammer.

Abb. 46: Fusion RITC- und FITC-gefärbter Haferprotoplasten in der Trommelkammer.

Abb. 47: Massenfusion in der Plattenkammer. Die abgebildeten Riesen-Fusionsprodukte bestehen aus etwa 15 Haferprotoplasten. Sie eignen sich besonders für elektrophysiologische Untersuchungen.

Abb. 48: FDA-gefärbte Haferprotoplasten nach Fusion in der Drahtkammer.



3.3.2. Fusion von Protoplasten

Die vorhandenen Protoplasten (P^+) und ihre Kompartimente (Miniprotoplasten (P^-), wurden in der Drahtkammer untereinander und in verschiedenen Kombinationen miteinander fusioniert. Dabei ergaben sich die in Tabelle 3 dargestellten Durchschnittswerte.

Tabelle 3:

Fusionsparameter	Sammlung f (MHz)	Puls E ($\frac{V}{cm}$)	Puls t (µs)	Abrundung t (min.)
$P(+)_{Avena} \times P(+)_{Avena}$	1	750	20	1 - 2
$P(+)_{Nicotiana} \times P(+)_{Nicotiana}$	1	750	20	3 - 5
$P(-)_{Avena} \times P(-)_{Avena}$	2	1000	20	5 - 20
$P(-)_{Nicotiana} \times P(-)_{Nicotiana}$	2	1500	55	20 - 60
$P(+)_{Vivia} \times P(+)_{Vicia}$	1	750	50	2 - 3
$P(+)_{Avena} \times P(-)_{Nicotiana}$	2	1500	20	10 - 30

Die Fusionsausbeute lag bei 70 - 80 %.

Frisch evakuolisierte Protoplasten platzten bei der Pulsgabe. Erst nach Lagerung in Sorbitpuffer über Nacht bei 4°C ließen sie sich am folgenden Tag fusionieren. Dies ist wahrscheinlich auf die hohe Calciumkonzentration (100 mM) im Percollpuffer zurückzuführen.

Zugabe von $CaCl_2$ (bis 5 mM) ins Fusionsmedium beeinflußte die Abrundungszeit nicht.

Für die Fusion in der Mäanderkammer waren 1,5-fach höhere Feldstärken erforderlich. Die Dicke dieser Elektroden beträgt nur wenig µm, so daß die Protoplasten nicht zwischen die Elektroden zu liegen kamen. Dadurch erniedrigte sich auch die Fusionsrate (50 - 70 %).

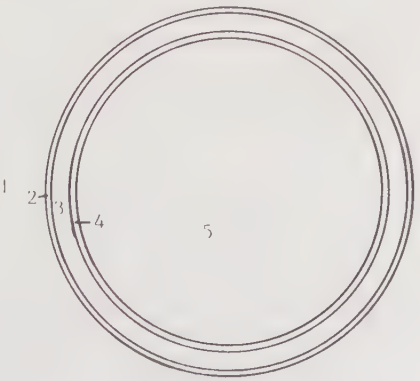
3.3.3. Diskussion

Untersuchungen an Erythrozyten, Algenzellen, Chloroplasten und künstlichen Membranen zeigten, daß eine Membranpotentialdifferenz von etwa 1 V nötig ist, um Membrandurchbruch zu erzielen. Dies wurde entweder über Mikroelektroden, den Stoffaustausch durch die Membran oder über Widerstandsmessungen in Partikelanalysatoren nachgewiesen (Benz et al. 1979; Pilwat et al. 1980; Zimmermann et al. 1981). Da die Durchbruchspannung pulslängenabhängig ist, sind diese Angaben nur als Richtwerte zu verstehen. Die für Mesophyllprotoplasten aus der Fusion bestimmte Membrandurchbruchspannung von 2,2 - 2,4 V ist aber nur durch die Existenz von zwei Membranen, nämlich Plasmalemma und Tonoplast, zu erklären, welche in Reihe geschaltet sind.

Diese Annahme wird durch die Messung an evakuolisierten Protoplasten unterstützt, die nur noch die Plasmalemmamembran besitzen und damit eine niedrige Membrandurchbruchspannung benötigen. Daß die mit anderen Methoden erhaltenen Werte von 1 beziehungsweise 2 V nicht erzielt wurden, kann folgende Gründe haben:

Abb. 49: Schalenmodell eines Protoplasten

1. Externes Medium
2. Plasmalemma
3. Zytoplasma
4. Tonoplast
5. Vakuole



1. Die schrittweise Erhöhung der Pulsspannung führt auf jeden Fall zu einer Überbestimmung der Durchbruchspannung.

2. Elektrischer Durchbruch in der Kontaktzone muß nicht in jedem Fall zur Fusion führen, da vor allem bei den "viskoseren" P(-) Protoplasten eine Fusion wahrscheinlich nur dann eintreten kann, wenn ein größerer Membranbereich gestört wird.

3. Wie in 3.2 gezeigt, verursachen die Protoplasten eine Feldverzerrung, was zu einer höheren Feldstärke im Kontaktbereich führt. Berechnungen für das homogene Feld sind somit nur näherungsweise gültig.

4. Die Berechnung der Membrandurchbruchspannung mit Hilfe von Gleichung 2 wurde für den stationären Fall durchgeführt; also unter der Annahme, daß die erzeugte Membranpotentialdifferenz den maximalen Wert erreicht. Aufgrund der Widerstände von intra- und extrazellulärer Lösung, sowie Membranwiderstand und Kapazität erfolgt die Ladungstrennung über der Membran mit einer gewissen Verzögerung (Relaxation). Der Relaxationsprozeß wird durch die Relaxationszeit τ beschrieben. Diese ergibt sich aus Gleichung 3.

Gleichung 3:
$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{C_m \cdot r\,(\varrho_i + 0{,}5\,\varrho_e)}$$

		angenommene Werte
C_m	= spezifische Membrankapazität	10^{-6} F/cm²
ϱ_i	= interner spez. Widerstand	$\ll \varrho_e$
ϱ_e	= externer spez. Widerstand	$10^5\,\Omega\cdot$cm
r	= Zellradius	20 µm

τ ist die Zeit, bei welcher 63,2 % des stationären Potentials erreicht sind. Durch den asymptotischen Verlauf der Ladungskurve muß die Pulszeit fünfmal τ betragen, bis die maximale Potentialdifferenz an der Zelle erreicht wird (Zimmermann, persönliche Mitteilung).

Die Konsequenzen aus Gleichung 3 sind folgende: Die Relaxationszeit ist vom Radius der Zelle abhängig; kleine Protoplasten erreichen das maximale Membranpotential schneller als große. Erhöhung der äußeren Leitfähigkeit hat kürzere Aufladungszeit zur Folge. Eine grobe Abschätzung mit aus der Literatur entnommenen Zellparametern (Zimmermann 1982) ergibt eine Relaxationszeit von etwa 50 µs. Die damit theoretisch erforderliche Pulszeit von 250 µs führt aber zum irreversiblen Membrandurchbruch.

Der hohe Wert der Membrandurchbruchspannung für evakuolisierte Protoplasten kann auch darauf zurückzuführen sein, daß sich das induzierte Potential nicht gleichmäßig auf die beiden Membranen, Plasmalemma und Tonoplast, verteilt, was der Fall ist, wenn diese nicht etwa gleiches RC-Verhalten aufweisen. Dies ist zum Beispiel für die beiden Membranen von Chloroplasten der Fall (Pilwat et al. 1980).

Die gezeigte Möglichkeit der Bestimmung der Membrandurchbruchsapnnung über die Fusionsparameter ist vielleicht nicht geeignet, um genaue Meßwerte zu bekommen, aber sie stellt eine einfache Möglichkeit dar, Zwei-Membransysteme von Ein-Membransystemen zu unterscheiden wie im Fall von Protoplasten und Miniprotoplasten bzw. von Pseudovakuolen und Vakuolen.

Die mit der Fusionsmethode ermittelten Werte für normale Protoplasten von über 2 V lassen zwar die Möglichkeit offen, daß beide Membranen durchbrochen werden,jedoch kann dies mit der Fusionsmethode letztlich nicht bestimmt werden, da ja der Durchbruch der äußeren Plasmamembran für die Fusion der Protoplasten genügt. Zellorganellen wie Plastiden und Mitochondrien, die ebenfalls eine isolierende Membran besitzen, werden auf Grund ihrer geringen Größe vom Puls nicht betroffen.

3.4. Elektropermeabilisierung

In einer Drahtkammer (d ≈ 200 µm) wurden Hafer- und Tabak-Protoplasten einzelnen Pulsen ausgesetzt und ihre Anfärbung durch den im Medium vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff beobachtet (Abb. 50).

Bei genauer Betrachtung wurde deutlich, daß die Anfärbung der Zellen von der Seite ausging, die zur positiven Elektrode gerichtet war (Abb.52).

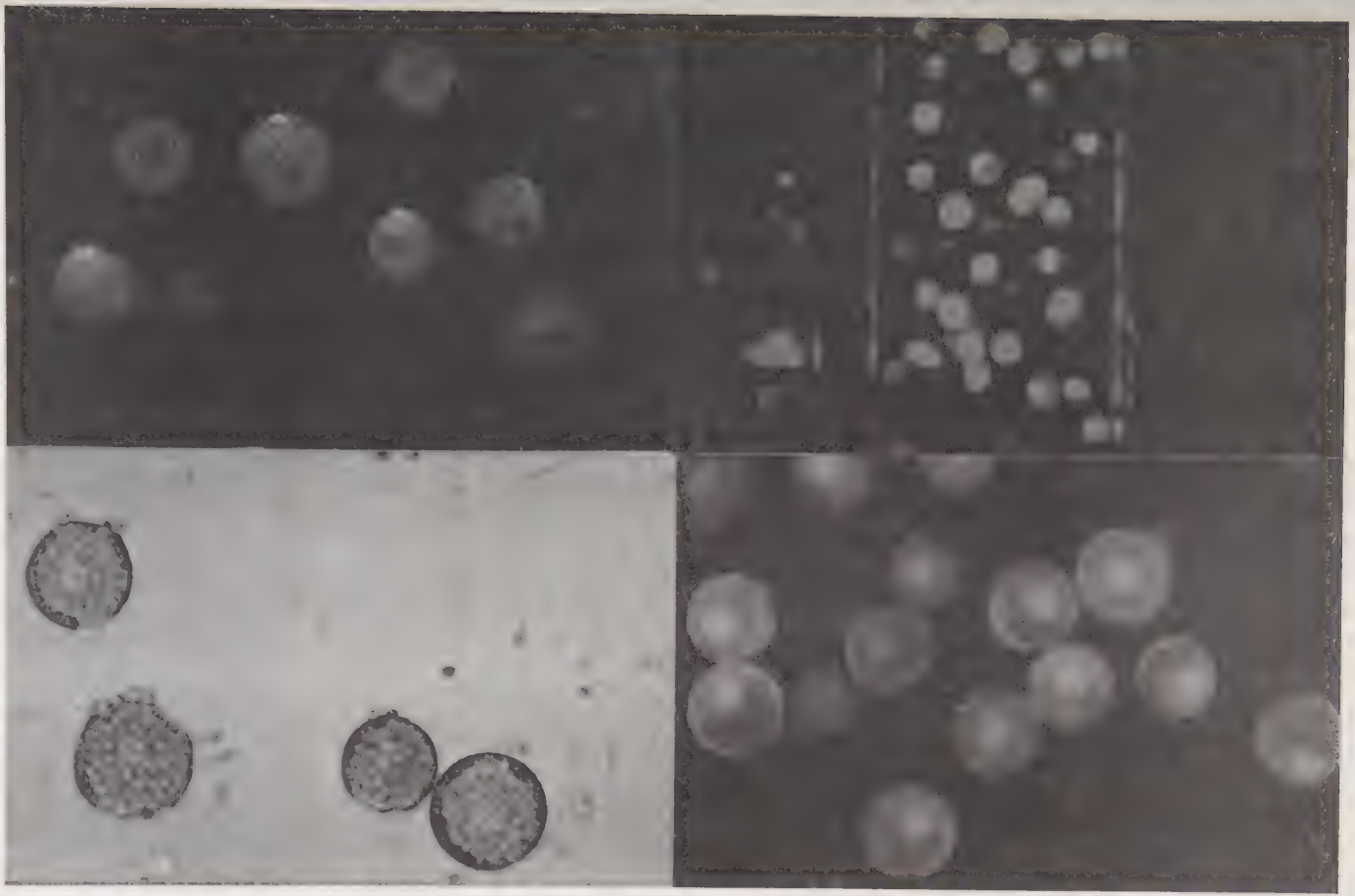
Eine Umkehrung der Feldrichtung (oder eine Drehung der Protoplasten durch Rotation) führte zu einer Farbstoffaufnahme an der entgegengesetzten Membranseite, das heißt, wiederum zur Anode hin gerichtet. Selbst bei überkritischen Feldstärken ($> 2 \frac{kV}{cm}$) fand die Farbstoffaufnahme an der Anodenseite statt. Allerdings traten dann bei machen Protoplasten an dieser Seite Chloroplasten aus (Abb. 53). Bei mehrmaligem Pulsen konnte sich ihre Anzahl erhöhen.

Abb. 50: Protoplasten in einer Ethidium Bromid-Färbelösung. 10 s nach einem Puls (1500 kV/cm, 20 µs) sind die Protoplasten in der Drahtkammer angefärbt. Außerhalb der Elektroden fluoreszieren nur geplatzte Protoplasten.

Abb. 51: Ethidiumbromid gefärbte Haferprotoplasten nach Pulsgabe. Die Intaktheit der Protoplasten wurde durch FDA überprüft. Der eingedrungene Farbstoff hat Kern und Plastiden deutlich angefärbt.

Abb. 52: Das Alkaloid Berberin ist normalerweise Plasmalemma - impermeabel. Beim induzierten Membrandurchbruch (1,5 kV, 20 µs) gelangt es von der zur Anode gerichteten Membranseite in den Protoplast und reagiert dort spezifisch mit Nukleinsäuren, wobei es zu einer gelben Anfärbung kommt.

Abb. 53: Feldinduzierter Ausstoß von Chloroplasten bei Avena Protoplasten nach zwei Pulsen von 3 kV/cm, 40 µs. Die Chloroplasten treten nur zur Anode hin aus und haften an der Außenseite des Plasmalemmas. Die Protoplasten zeigen keine sichtbare Schädigung.



Eine photometrische Messung gab Aufschluß über Farbstoffaufnahme und -verteilung innerhalb des Protoplasten (Abb. 54).

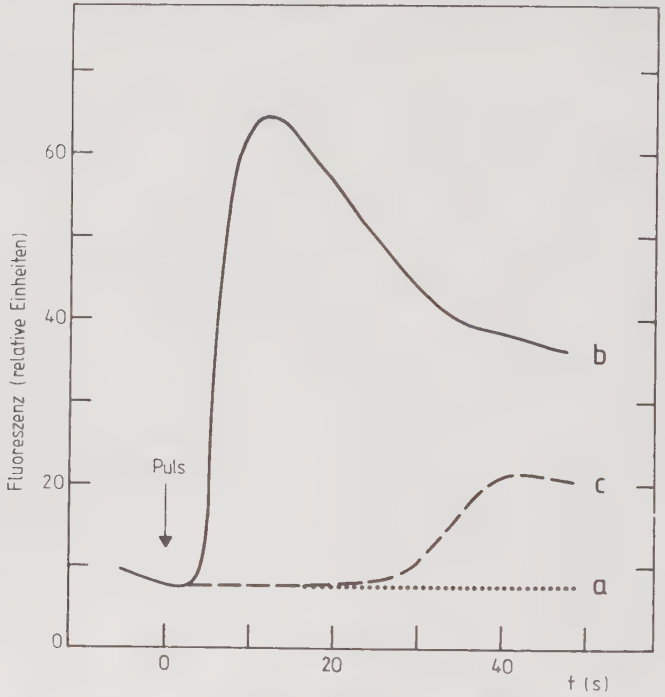


Abb. 54: Mikrofluoremetrische Bestimmung der elektrisch induzierten Aufnahme von Ethidiumbromid eines intakten Hafer-Mesophyllprotoplasten.

a) Der membranimpermeable Farbstoff dringt nur sehr langsam in die Zelle ein. Während der Beobachtungszeit wurde der Protoplast nicht angefärbt (Kontrolle).

b) Änderung der Fluoreszenzintensität an der Protoplastenseite die zur Anode gerichtet ist; nach einem Puls 2 kV/cm, 20 µs. Der Farbstoff dringt an der Anodenseite ein, färbt diese dabei stark an und verteilt sich rasch über die ganze Zelle. Nach etwa 40 s ist diese vollständig angefärbt. Die Einstromöffnung ist dann kaum noch zu erkennen (siehe auch Abb. 51).

c) Meßfeld des Mikroskopphotometers auf die Kathodenseite eines Protoplasten gerichtet. Die Kurve zeigt die zeitliche Verteilung des Farbstoffes innerhalb der Zelle.

Die Aufnahme des Farbstoffes und damit die "Porenbildung" ist von der Feldstärke und der Pulszeit abhängig (Zimmermann 1982). Um dies für Protoplasten nachzuweisen, wurden diese Parameter schrittweise verändert und die Anzahl der durch den Puls angefärbten Protoplasten bestimmt (Abb. 55).

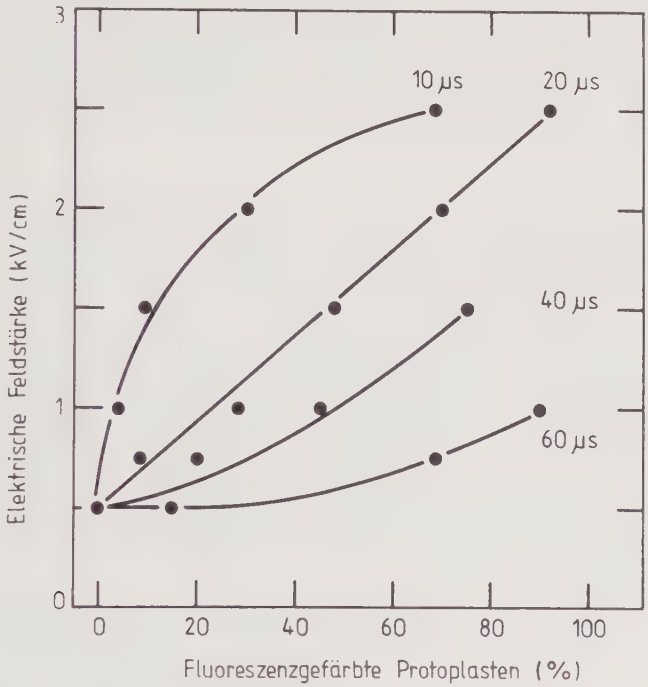


Abb. 55: Beziehung zwischen Intensität und Dauer eines elektrischen Pulses und der Anzahl perforierter (Ethidiumbromidgefärbter) Haferprotoplasten

Versuche mit FDA-gefärbten Protoplasten zeigten, daß durch Elektropermeabilisierung Stoffaustausch in beiden Richtungen ermöglicht wird. Ethidiumbromid färbt die Zelle an, während gleichzeitig Fluoreszein aus dem Protoplasten entweicht. Die Abnahme ist jedoch meist sehr gering und hört schon nach wenigen Sekunden wieder auf. Selbst bei Freisetzung von Chloroplasten durch hohe Feldpulse kommt es in einigen Fällen wieder zur Ausheilung der Membran.

Chloroplastenaustritt bei hohen Feldpulsen und anschließende Ausheilung des Plasmalemmas wurde auch von Zimmermann (1982) beobachtet.

Eine zusätzliche Überprüfung der Intaktheit durch Zellelektrophorese bestätigte, daß die elektrischen Eigenschaften der durchbrochenen Membranen wiederhergestellt waren. Beim Anlegen einer Gleichspannung bewegten sich die angefärbten Protoplasten in Richtung Anode. Geplatzte Protoplasten wanderten nicht.

Feldstärken über 4 kV in Verbindung mit langen Pulszeiten ($>$50 µs) oder Mehrfachpulsen führten zu einer irreversiblen Schädigung der Membran.

In einem weiteren Versuch wurden, statt Farbstoff, Bakterien (Pseudomonas aeruginosa) zugegeben. Nach Pulsgabe reicherten sich die Bakterien auf Grund ihrer Chemotaxis zu Zellinhaltsstoffen (siehe 3.4.1.2.) an der zur Anode gerichteten Seite der Protoplasten an. Um sicher zu gehen, daß es sich hierbei nicht um Aerotaxis handelte, wurde das Präparat bei Grünlicht betrachtet.

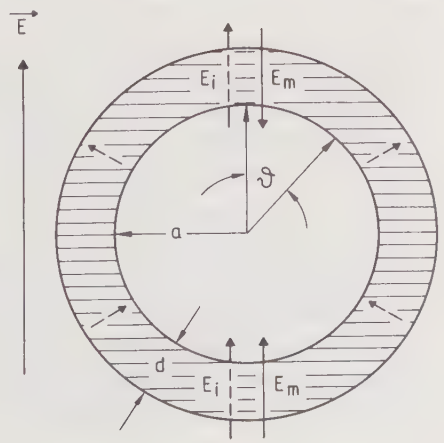
Etwa 5 Minuten nach Pulsgabe lösten sich an den intakt gebliebenen Protoplasten die Bakterienansammlungen wieder auf. Der elektrische Membrandurchbruch war reversibel. Bei Beleuchtung mit Weißlicht bildeten die gepulsten Protoplasten wieder Sauerstoff.

3.4.1. Diskussion

Die Experimente zur Elektropermeabilisierung zeigen, daß die Aufnahme der impermeablen Farbstoffe, und damit der elektrische Membrandurchbruch, nur auf einer Membranseite erfolgt. Gemäß der Laplace-Gleichung (2) ist das in einer sphärischen Zelle induzierte Potential an den zwei Membranseiten, die in Feldrichtung orientiert sind (cos 0° = 1), maximal und gleich groß. Folglich müßte auf beiden Seiten Porenbildung und Farbstoffeintritt erfolgen. Dies wurde jedoch nicht beobachtet.

Eine mögliche Erklärung für die asymmetrische Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe kann das natürliche Membranpotential der Zelle darstellen, welches in Gleichung 2 nicht berücksichtigt wird. Dieses intrinsische Potential setzt sich aus Oberflächenpotential, Diffusionspotential und der Wirkung endogener Pumpen zusammen und hat eine Negativierung der Membraninnenseite zur Folge. Bei Algenzellen und Lebermoosen wurden Membranpotentiale bis -400 mV gemessen (Bentrup 1985). Realistische Werte für Protoplasten aus Höheren Pflanzen sind -80 bis -100 mV für das zytoplasmatische Potential, ohne Berücksichtigung der Vakuole. Zum Vergleich: die für den elektrischen Durchbruch induzierte Spannung beträgt etwa 1 V.

Abb. 56:
Schematische Darstellung eines Protoplasten im elektrischen Feld zweier ausgedehnter Elektroden.



a Radius
d Membrandicke
ϑ Winkel zwischen einem Membranpunkt und der Feldrichtung
E äußeres Feld
E_i induziertes Transmembranfeld
E_m Feld des endogenen Membranpotentials U_m

Aus Abb. 56 ist ersichtlich, daß das induzierte Feld E_i auf beiden Seiten der Zelle in dieselbe Richtung zeigt, während das endogene Feld E_m überall von außen nach innen gerichtet ist. Auf der Zellseite, welche der positiven Elektrode zugewandt ist, sind beide Feldvektoren parallel. Auf der gegenüberliegenden Seite, also zur Kathode hin, sind sie antiparallel. Da die Felder einmal gleich und einmal entgegengesetzt sind, unterscheidet sich das gesamte Transmembranpotential an beiden Polen um den doppelten Wert der natürlichen Membranspannung U_m.

Der Durchbruch erfolgt an der Stelle der höchsten Feldstärke, also zur Anode hin (parallele Überlagerung). Der deutliche Potentialunterschied von etwa 20 % darf also bei der Betrachtung des Membrandurchbruchs nicht außer Acht gelassen werden. Gleichung 2 erfährt damit folgende Modifikation:

$$\vec{E}_c = \vec{E}_i + \vec{E}_m, \qquad \vec{E}_c = \text{kritische Feldstärke}$$

Eine Betrachtung für die Zellpole ergibt für die kritische Membranspannung U_c

$$U_c = 1{,}5 \cdot r \cdot E_i \pm U_m$$

Da das induzierte Feld E_i an einer Seite von außen nach innen und an der anderen Seite von innen nach außen gerichtet ist, bedeutet dies, daß die Zellseite zur Kathode depolarisiert und die zur Anode hyperpolarisiert wird. Ausschlaggebend für den Membrandurchbruch an der Anodenseite ist dabei nicht unbedingt nur der Unterschied der Membranpotentiale allein, sondern, wie aus elektrophysiologischen Messungen an tierischen Zellen bekannt ist, kann gleichstarke De- und Hyperpolarisation verschiedene Auswirkungen auf die Membran haben.

Durchbruch und damit verbundener Farbstoffeinstrom findet also an der zur Anode gerichteten Protoplastenseite statt. Daß auch bei überkritischen Feldpulsen (größer 2000 $\frac{V}{cm}$) nur diese eine Membranseite durchbricht, ist so zu verstehen, daß es bereits bei der Aufladung zu einem elektrischen Durch-

bruch kommt, wenn die Membranspannung von 1 V überschritten wird. Aus Ladungspulsexperimenten ist bekannt, daß der Durchbruch an künstlichen Membranen innerhalb von 10 ns erfolgt (Zimmermann et al. 1981), also innerhalb der Anstiegsflanke des Feldpulses möglich ist.

Beim elektrischen Durchbruch wird die Membran leitfähig. Durch diesen Zusammenbruch des Membranwiderstandes kann die Durchbruchspannung nicht überschritten werden. Solange die Membran leitend ist, kommt es also zu keinem weiteren Durchbruch - auch nicht am gegenüberliegenden Zellpol. Daß ein zweiter und dritter Durchbruch erzielt wird, ist darauf zurückzuführen, daß die Membran ausheilt und erneut aufgeladen werden kann.

Die Doppelpulsmethode demonstriert das Ausheilen der Membran im Anschluß an den elektrischen Durchbruch. Daraus kann auch der zeitliche Verlauf, mit dem sich die elektrisch induzierten Poren wieder schließen, bestimmt werden. Da es einige Sekunden dauert, bis die Anfärbung der Zellorganellen durch den eingedrungenen Farbstoff sichtbar wird, kann die Zeitkonstante nur abgeschätzt werden. Sie liegt im Bereich von Sekunden. Zeitkonstanten von Sekunden bis Minuten wurden auch von Zimmermann et al. (1980) mit einer anderen Technik gefunden. Bei tieferen Temperaturen dauert die Ausheilung länger.

Diese Interpretationen stehen auch in Übereinstimmung mit den von Farkas et al. (1980) und Korenstein et al. (1984) gewonnenen Beobachtungen zur elektrisch induzierten polarisierten Lumineszenz von Chloroplasten-'blebs'.

Daß andere Mechanismen wie Mikroelektrophorese der geladenen Farbstoffe, Elektroosmose, pH-induzierte Farbstoffveränderungen oder Oberflächenladungen der Protoplasten die einseitige Anfärbung bewirken, ist unwahrscheinlich, da auch der gut zu beobachtende Austritt der Chloroplasten immer nur zur Anodenseite hin erfolgte.

Die asymmetrische "Porenbildung" gibt weiteren Aufschluß über den Mechanismus der Elektrofusion von Protoplasten. Sie veranlaßt zu der Hypothese, daß die Zellen nur zur Anodenseite hin durchbrochen werden und sich die Störung der Membranstruktur auf die Kathodenseite der Nachbarzelle überträgt (Abb. 57).

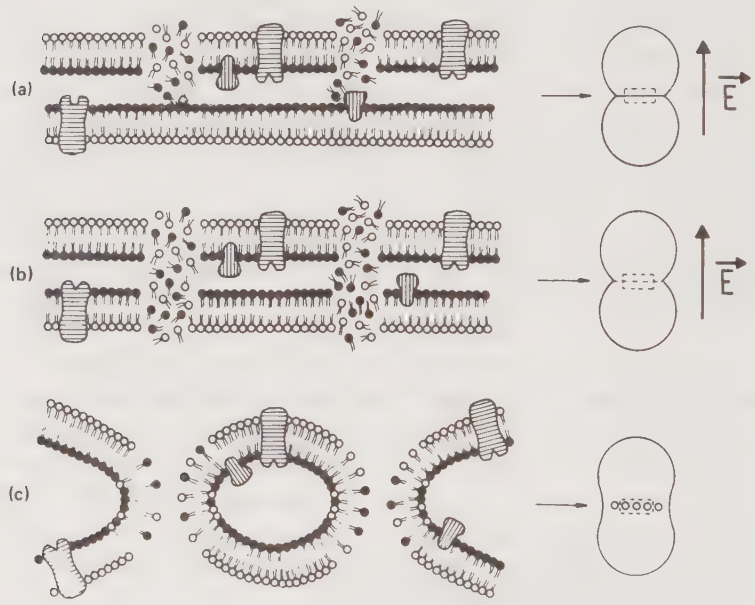


Abb. 57: Hypothetischer Mechanismus für die Fusion biologischer Zellen (nach Vienken et al. 1983, verändert)

a) Membranen zweier dielektrophoretisch gesammelter Zellen in engem Kontakt. Durch den elektrischen Puls wurde die zur positiven Elektrode orientierte Membran durchbrochen.

b) Die Störung überträgt sich auf die Membran der benachbarten Zelle.

c) Es bilden sich Lipidbrücken zwischen den Membranen, wobei Vesikel entstehen. Die beiden Zellmembranen verschmelzen, die Zellen runden sich ab.

3.5. Erarbeitung von Methoden zur Vitalitätsbestimmung einzelner Protoplasten

Zur Bestimmung der Integrität einzelner Protoplasten sollten Färbemethoden und stoffwechselphysiologische Parameter eingesetzt und miteinander verglichen werden.

Die Photosynthese, als einem der komplexesten Stoffwechselvorgänge in der Zelle, ist ein sensitiver und oft verwendeter biochemischer Parameter. Die Funktion läßt sich problemlos über die lichtabhängige Sauerstoff-Produktion und den respiratorischen Sauerstoff-Verbrauch mit der O_2-Elektrode bestimmen.

Protoplasten entwickeln bei Belichtung 5 - 30 µmol O_2 pro 10^6 Protoplasten * h (3.1.1.). Daraus ergibt sich für die photosynthetische O_2-Bildung eines einzelnen Protoplasten eine Rate von 5 - 30 pmol/h. Für Messungen im pmol-Bereich reicht aber die Empfindlichkeit der gebräuchlichen Methoden zur Sauerstoffbestimmung wie Polarographie oder Manometrie (untere Nachweisgrenze: 10^{-5} M) nicht aus.

3.5.1. Nachweis der photosynthetischen O_2-Produktion einzelner Protoplasten durch die Aerotaxis von Bakterien

Die von Engelmann 1881 eingeführte Bakterienmethode wurde auf die Messung des O_2-Gaswechsels einzelner Protoplasten angewandt und weiterentwickelt. Dieses Meßverfahren erlaubt, noch den billionstel Teil eines Milligramm O_2 (ca. 60 fmol) anzuzeigen (Pfeffer 1897).

Parallel zu den Bakterientests wurde in Makroansätzen die Sauerstoff-Bildung der gleichen Protoplastensuspensionen in einer O_2-Elektrode gemessen.

3.5.1.1. Optimierung der Versuchsbedingungen

Die überaus empfindliche Reaktion der Bakterien auf Sauerstoff erforderte ein dicht abgeschlossenes Präparat und ein bestimmtes Verhältnis von Protoplasten zu Bakterien. Zuviel Protoplasten führten bei Belichtung zu einer schnellen O_2-Sättigung des Präparates und damit zu einer schnellen Verteilung der Bakterien im Präparat. Bei einer zu hohen Bakteriendichte war eine Ansammlung um die Protoplasten schlecht zu erkennen. Optimale Versuchsbedingungen wurden jedesmal durch verschiedene Verdünnungsstufen ausgetestet. Da das Präparat zunächst mit Luftsauerstoff gesättigt ist, mußte es vor dem Versuch etwa 15 Minuten verdunkelt werden, bis der gelöste Sauerstoff von Bakterien und Protoplasten konsumiert war. Dabei kam die Bewegung der Bakterien bald zum Stillstand.

Damit die Bakterien unter dem Mikroskop gut sichtbar waren, mußte Phasenkontrast- oder Dunkelfeldbeleuchtung angewendet werden. Bei diesen Mikroskopierverfahren geht ein Großteil der Lichtintensität verloren. Da bei den Protoplasten O_2 erst nach außen tritt, wenn die Photosynthese die Atmung übersteigt, mußte die Betrachtung bei voller Lampenspannung erfolgen.

Zum Scannen eines Präparates nach vitalen Protoplasten wurde dieses zusätzlich mit einer Kaltlichtleuchte bestrahlt. Eine Filterung des Lichtes auf die photosynthetisch wirksamen Bereiche brachte keine Vorteile, da die Betrachtung im Rotlicht erschwert wurde. Lediglich grünes Licht war zur Beobachtung in der Dunkelphase geeignet.

Abb. 58: Tabakprotoplast in einem bis dahin verdunkelten Präparat. Die beweglichen Pseudomonaden sind statistisch verteilt. Mikroblitz und Phasenkontrast (500x)

Abb. 59: Präparat 1 min. belichtet. Die Bakterien beginnen sich um den sauerstoffproduzierenden Protoplasten zu sammeln.

Abb. 60: 5 min. belichtet. Die maximale Bakterienkonzentration um den Protoplasten ist erreicht. Dieser wird durch die Bakterienbewegung in Rotation versetzt.

3.5.1.2. Unterscheidung zwischen Chemotaxis und Aerotaxis

Zu Beginn der Belichtung eines frischen Präparates wurden auch geplatzte Protoplasten und sogar freigesetzte Vakuolen von den aerotaktischen Bakterien angeschwommen (Abb. 63). Hierbei ließ sich eine lichtabhängige und eine lichtunabhängige Reaktion unterscheiden. Die erstgenannte ist nur auf photosynthetisch erzeugten Sauerstoff zurückzuführen. Offensichtlich produzieren frisch geplatzte Protoplasten wenigstens noch einige Zeit lang Sauerstoff.

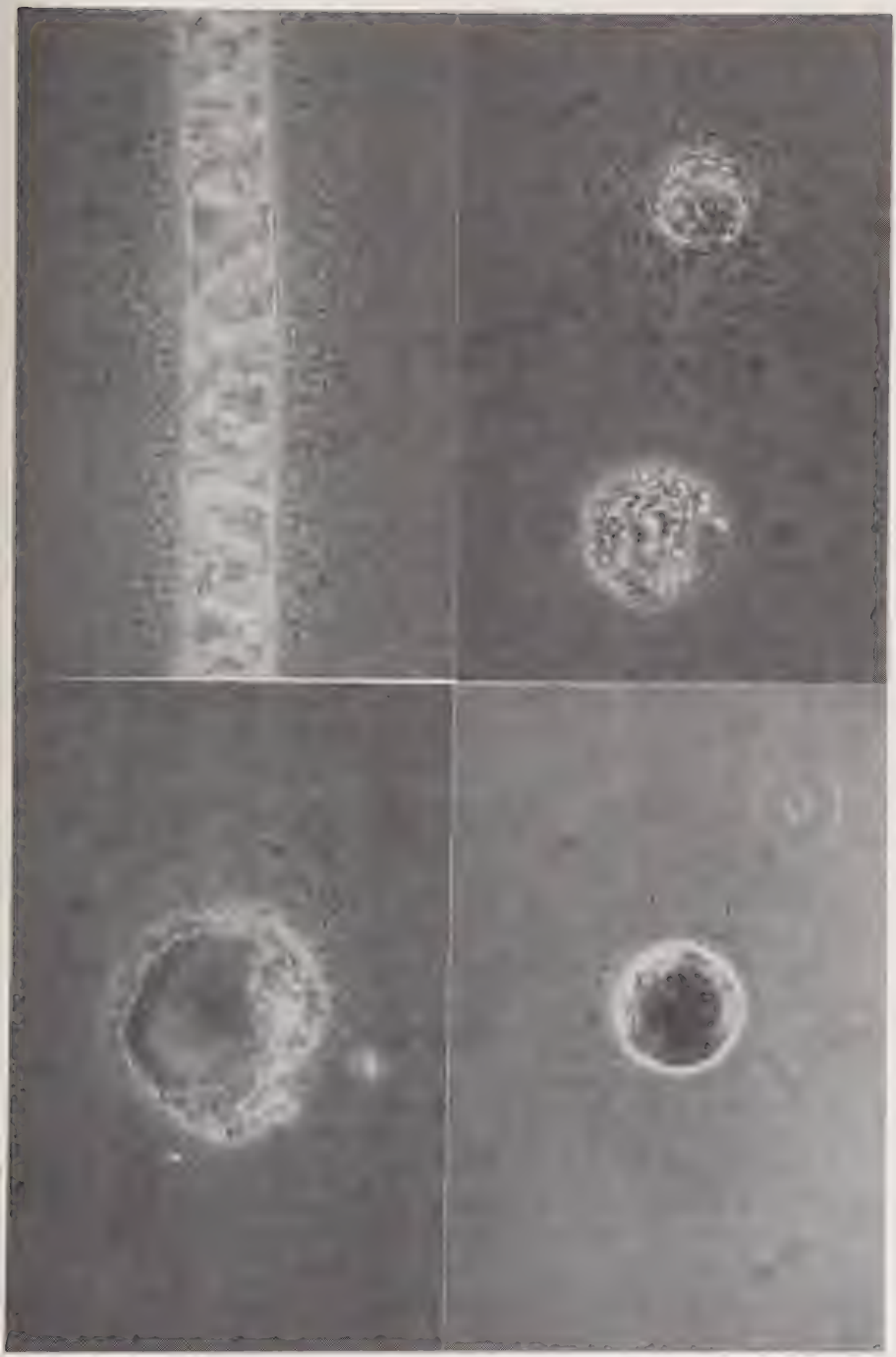
Nach 10 - 20 Minuten hörte die Sauerstoffbildung geplatzter Protoplasten von selbst auf.

Abb. 61: Engelmann's historisches Experiment.
An einem luftdicht abgeschlossenen Algenfaden (Spirogyra) sammeln sich bei Belichtung die Bakterien an der Zellwand an.

Abb. 62: Zwei Avena- Protoplasten im Phasenkontrast.
Nur der intakt aussehende wird bei Belichtung von den Bakterien angeschwommen. Offensichtlich ist nur dieser auch physiologisch intakt.

Abb. 63: Frisch geplatzter Tabakprotoplast. An der Austrittsstelle der Vakuole sammeln sich die Bakterien. Diese chemotaktische Reaktion ist lichtunabhängig, bleibt also auch im Dunkel bestehen.

Abb. 64: Epidermisprotoplast aus Gelenkzellen von Phaseolus coccineus (Erath, 1986). Die Bakterien schwimmen zu der Protoplastenseite, an der sich die meisten Chloroplasten befinden. Dies zeigt, wie empfindlich Pseudomonas aeruginosa auf Sauerstoff reagiert.



Es wurde versucht, eine Reduzierung oder Unterdrückung dieser unerwünschten O_2-Produktion durch folgende Mittel zu erreichen:

- Zugabe von $CaCl_2$ (Leegood & Walker 1983, Wirtz et al. 1980)

- Verwendung Plasmalemma-impermeabler Hemmstoffe der Photosynthese

Mit Parallelmessungen an der O_2-Elektrode wurden die Bakterientests überprüft (Abb. 65)

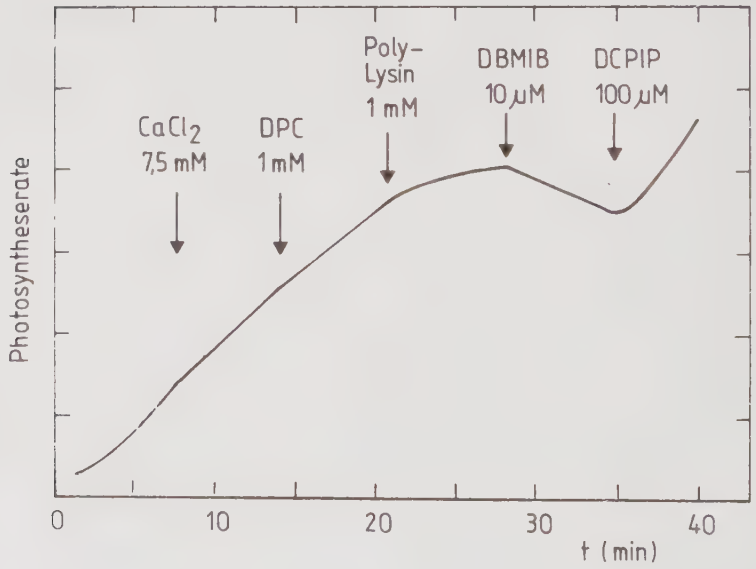


Abb. 65: Sauerstoffentwicklung einer Protoplastensuspension gemessen mit der O_2-Elektrode.
Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die photosynthetische Sauerstoffentwicklung.

7,5 mM $CaCl_2$ (Elektrodenpuffer) hemmte die O_2-Entwicklung mechanisch geschädigter Protoplasten (Intaktheitsrate etwa 50 %) etwas, brachte sie jedoch nicht zum Erliegen.

Hemmstoffe der Photosynthese: DCMU und DBMIB sind plasmalemmapermeabel (Goller et al. 1982) und inhibierten sowohl die O_2-Produktion geplatzter als auch die intakter Protoplasten. Poly-L-Lysin und DPC verringerten zwar die Photosynthese geplatzter Protoplasten, schädigten jedoch bei längerer Inkubation auch die übrigen Protoplasten.

Bei der lichtunabhängigen Reaktion blieb die Taxis der Bakterien auch beim abgedunkelten Präparat bestehen. Diese Reaktion der Bakterien ist nur so zu erklären, daß durch die Lyse der Protoplasten Stoffe (Zucker, Salze etc.) freigesetzt werden, auf die Pseudomonas aeruginosa chemotaktisch reagiert.

Drei mögliche Ursachen wurden weiter untersucht:

- K^+-leaking intakter Protoplasten
- Nitrat-Atmung der Bakterien
- Ansäuerung durch geplatzte Protoplasten

Weder Zugabe von 5 mM KCl oder 5 mM Na-Nitrat, noch Absenkung des pH auf 4,5, brachte die Chemotaxis zum Erliegen. Selbst Verwendung eines komplexen Nährmediums (Seitz und Richter 1970) mit vielen organischen und anorganischen Verbindungen konnte diese Reaktion nicht vollständig verhindern.

Da die Chemotaxis der Bakterien nicht näher spezifiziert und damit ausgeschaltet werden konnte, blieb nur die Möglichkeit, die aerotaktische gegenüber der chemotaktischen Reaktion dadurch hervorzuheben, daß Sauerstoff zum Minimumfaktor wurde.

Dies wurde auf 2 Wegen erreicht:

1. respiratorischer Verbrauch von Sauerstoff durch Protoplasten und Bakterien

2. enzymatisch katalysierte Umsetzung des produzierten Sauerstoffs.

Zur Senkung des O_2-Gehaltes im Medium wurde das Präparat abgedunkelt. Protoplasten und Bakterien konsumierten dabei den Sauerstoff. Diese Wartezeit hing stark von Protoplastendichte und Bakterienzahl ab und konnte bis zu einer Stunde betragen. Gleichzeitig verteilten sich die von defekten Protoplasten freigesetzten Zellinhaltsstoffe durch Diffusion, so daß nach dieser Zeit nur noch selten Chemotaxis beobachtet werden konnte.

Die zweite Methode basierte auf der Reaktion beim Glycolatoxidase-Test (2.7.4.3.).

$$\text{Glycolat} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glycolat-Oxidase}} \text{Glyoxylat} + H_2O_2$$

Diese Reaktion findet nur in geplatzten Protoplasten statt. Bei Zugabe von Glycolat (75 mM) verarmte die Umgebung geschädigter Protoplasten an O_2, so daß diese von P. aeruginosa gemieden wurden. Zur Kontrolle wurden die Protoplasten nach einer Dunkelphase betrachtet. Chemotaxis wurde jetzt nicht mehr beobachtet. Damit wurde eine Steigerung der Sensitivität dieser Bakterienmethode erreicht. Da jetzt leicht defekte Protoplasten, deren Membran für Glycolat permeabel war, einen Nettoverbrauch von O_2 aufwiesen, wurden nur noch vollständig intakte Protoplasten angeschwommen.

3.5.2. Vergleich verschiedener Vitalitätstests mit dem Pseudomonas-Versuch

Von den verschiedenen Möglichkeiten, die Lebensfähigkeit der Protoplasten festzustellen, wurden die optische Kontrolle, das heißt sphärische Form im Phasenkontrast, die Anfärbung mit Ausschlußfarbstoffen, wie Evan's Blue und Phenosafranin, und die FDA-Fluoreszenz mit dem Nachweis über die photosynthetische O_2-Produktion durch die Aerotaxis von Pseudomonas aeruginosa verglichen (Abb. 66 - 68).

Dazu wurden Vicia-Mesophyllprotoplasten vier Tage lang im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und anschließend die Vitalitätsraten nach den oben angeführten Methoden bestimmt. Bei jedem Präparat wurden 200 intakt aussehende Protoplasten (≙ 100 %) ausgezählt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich von Vitalitätsmarker

	Evan's Blue	Phenosafranin	FDA
intakte Protoplasten	96 %	93 %	66 %
Bakterientext	54 %	53 %	47 %

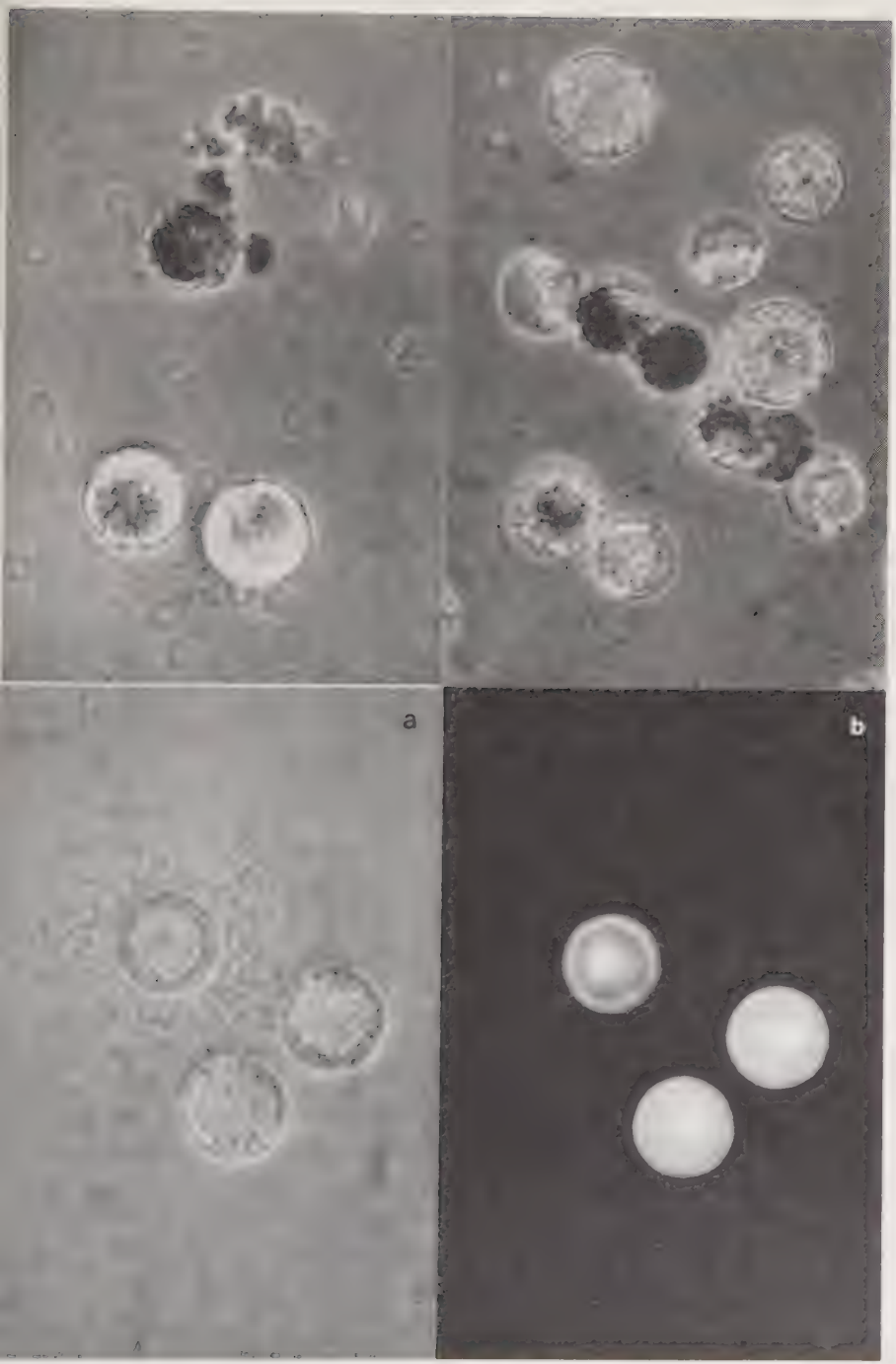
Die Ausschlußfarbstoffe Evan's Blue und Phenosafranin färbten fast nur solche Protoplasten an, die schon vom optischen Eindruck her als defekt angesehen werden konnten. Diese Zellen wurden aber schon vorher gar nicht mitgezählt. Eine leichte Anfärbung durch Evan's Blue war durch den schlechten Kontrast zu den grünen Protoplasten kaum zu erkennen. Die Rotfärbung durch Phenosafranin trat besser hervor; deshalb ergaben sich sensitivere Werte.

FDA färbte das Zytoplasma der Protoplasten deutlich an. Kern und Chloroplasten hoben sich durch stärkere Fluoreszenz hervor. Obwohl Vakuolen Esterasen enthalten, zeigten sie keine Fluoreszenz. Der Grund dafür dürfte die pH-abhängige Fluoreszenzintensität von Fluorescein sein (Hager et al. 1986). Im Gegensatz zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen bindet Fluorescein offensichtlich nicht an Zellstrukturen, da nach dem Platzen von gefärbten Zellen diese innerhalb weniger Sekunden wieder vollständig durch das Austreten des Farbstoffes entfärbt waren. Verglichen mit den anderen Färbemethoden, war bei FDA-gefärbten Protoplasten die mit P. aeruginosa gemessene Vitalitätsrate geringer. Kontrollversuche an der O_2-Elektrode bestätigten, daß FDA die Photosyntheserate je nach Färbezeit bis zu 70 % verringert.

Abb. 66: Vier Tage alte Vicia faba - Protoplasten.
Ein geplatzter Protoplast ist durch den Ausschlußfarbstoff Evan's Blue stark angefärbt. Bei den anderen Protoplasten ist zwar durch die polare Chloroplastenverteilung ihre schlechte Konstitution sichtbar; sie sind jedoch nicht angefärbt. Keiner der Protoplasten wird bei Belichtung von den Pseudomonaden angeschwommen.

Abb. 67: Wie Abb. 66, jedoch sind die Protoplasten mit Phenosafranin versetzt. Auch dieser Farbstoff färbt nur geplatzte Protoplasten an. Bei keinem Protoplasten wird durch die Bakterien eine physiologische Intaktheit angezeigt.

Abb. 68: Vergleich Bakterientest (a) und FDA-Färbung (b) an vier Tage alten Vicia-Protoplasten.
Alle Protoplasten zeigen FDA-Fluoreszenz, jedoch nur einer produziert geringe Mengen Sauerstoff.


a
b

Die Differenz zwischen Färbemethode und physiologischem Test wurde umso offensichtlicher, je älter die Protoplasten waren. Dies zeigte ein Vergleich von FDA-Färbung, Bakterientest und Messungen an der O_2-Elektrode an Haferprotoplasten (Abb. 69).

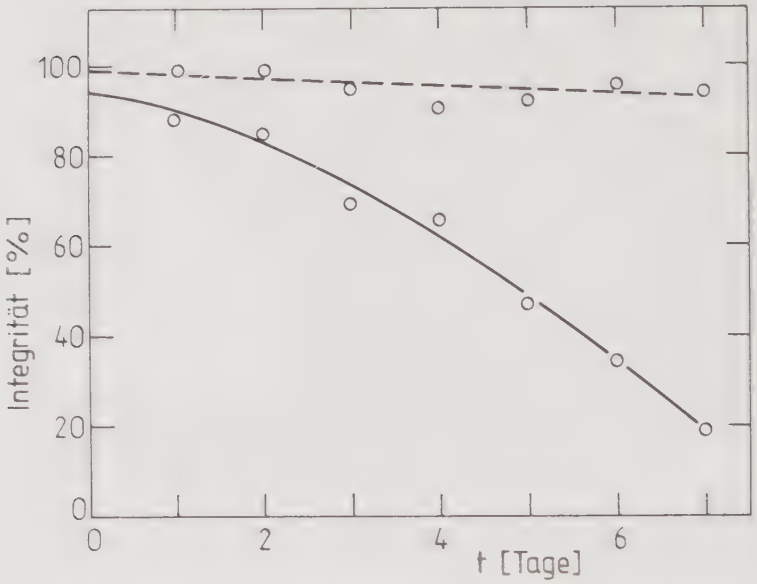


Abb. 69: Vitalitätsabnahme einer Hafer-Protoplastenpopulation bei Lagerung

Mesophyllprotoplasten wurden über sieben Tage bei 4°C gelagert. Die Intaktheit wurde durch Fluoresceindiacetat-Färbung (- - -) und den Pseudomonas Versuch (————) bestimmt. Es wurden nur im Phasenkontrast intakt aussehende Protoplasten ausgewertet.

3.5.3. Diskussion

Die Frage nach der Zuverlässigkeit der Färbemethoden zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Protoplasten wurde schon früher gestellt. Bornman et al. (1982) zeigten, daß solche Färbemethoden bezüglich Farbkonzentration und Färbezeit standardisiert werden müssen. Smith et al. (1982) berichteten, daß die Färbeeigenschaften von Zellkulturen nicht mit ihrer Fähigkeit zur Subkultivierung übereinstimmten.

Diese offensichtliche Diskrepanz zwischen physiologischer Vitalität und Membranintegrität wurde an Messungen mit einzelnen Protoplasten augenscheinlich. Die Fehlerhaftigkeit dieser Methode zeigte sich besonders deutlich bei den Ausschlußfarbstoffen. Sie können lediglich als Indikatoren für die Schädigung des Plasmalemmas dienen, aber nicht für die physiologische Intaktheit der Protoplasten.

Die Methode der Vitalfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoffen ist heute zwar allgemein akzeptiert (Larkin 1976, Galbraith & Mauch 1980), jedoch konnte gezeigt werden, daß sie die Funktion der Protoplasten beeinflussen. So ergaben sich FITC, RITC und FDA je nach Inkubationszeit erheblich verringerte Sauerstoffraten. An frisch isolierten Protoplasten zeigten vergleichende Messungen von Bakterientest, Glycolatoxidase-Test und FDA-Färbung übereinstimmend hohe Vitalitätsraten. Jedoch machten Untersuchungen an gealterten Protoplasten deutlich, daß die Verschlechterung der physiologischen und der Plasmamembran-Integrität verschieden schnell fortschreitet.

Die Kombination von Glycolat-Oxidase-Reaktion und Bakterientest erlaubte eindeutigere Aussagen über die Vitalität der Protoplasten, da sowohl Membranintegrität als auch photosynthetische Sauerstoffproduktion die Voraussetzung für eine positive Bakterienreaktion bilden.

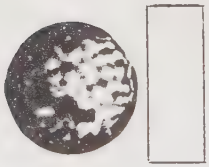
3.6. Erarbeitung einer Methode zur semiquantitativen Bestimmung der O_2-Produktion einzelner Protoplasten

3.6.1. Optimierung der Versuchsbedingungen

Für die Anwendung der Dunkelfeldmikroskopie war es besonders wichtig, den Anteil toter Bakterien im Präparat so gering wie möglich zu halten, da diese Verunreinigungen den Hintergrund aufhellten und damit den Kontrast verminderten. Aus diesem Grunde wurden nur verdünnte Protoplasten- und Bakteriensuspensionen verwendet.

Da das vom Protoplasten ausgehende Streulicht nicht ausgeblendet werden konnte, wurden verschiedene Meßfeldeinstellungen des Mikroskopphotometers ausprobiert.

Seitliches Meßfeld



Dieses hatte den Vorteil, daß die Hintergrundstreuung sehr gering war. Allerdings hatte es den erheblichen Nachteil, daß bei zunehmender O_2-Produktion der Protoplast von den Bakterien bewegt wurde und das Meßfeld nachgeführt werden mußte.

Zentrales Meßfeld

Die Blendengröße wurde so gewählt, daß Protoplast und Bakterienhalo auch bei starker Bewegung im Meßfeld verblieben. Optimal erwies sich eine Blendenöffnung vom 2-fachen des Protoplastendurchmessers.

Kurzwelliges Licht wird stärker gestreut als langwelliges. Um diese physikalische Gesetzmäßigkeit auszunützen, wurden verschiedene Blaufilter vor dem Photometer in den Strahlengang gebracht. Die größten Intensitätsänderungen wurden mit einem Schott Interferenzfilter (493 nm) gemessen.

3.6.2. Messungen an Mesophyllprotoplasten

Frisch isolierte Protoplasten hatten eine geringe O_2-Produktion, die sich aber schon nach einigen Stunden bis zum nächsten Tag steigerte. Für die Messungen wurden deshalb nie frisch isolierte Protoplasten verwendet.

Abb. 70 zeigt den typischen Kurvenverlauf einer photometrischen Messung. Von der vorausgehenden Belichtung befinden sich noch Bakterien am Protoplasten. Nach erneuter Belichtung nahm die Lichtstreuung zunächst ab, weil die noch vorhandenen Bakterien vom Protoplasten wegschwammen. Dies ist höchstwahrscheinlich auf einen durch die Belichtung induzierten elektrischen Effekt in den Protoplasten zurückzuführen. Nach etwa 15 Sekunden begann eine stetige Zunahme der Bakteriendichte um den Protoplasten, die nach 3 - 4 Minuten ihr Maximum erreichte und dann auf einem konstanten Niveau blieb.

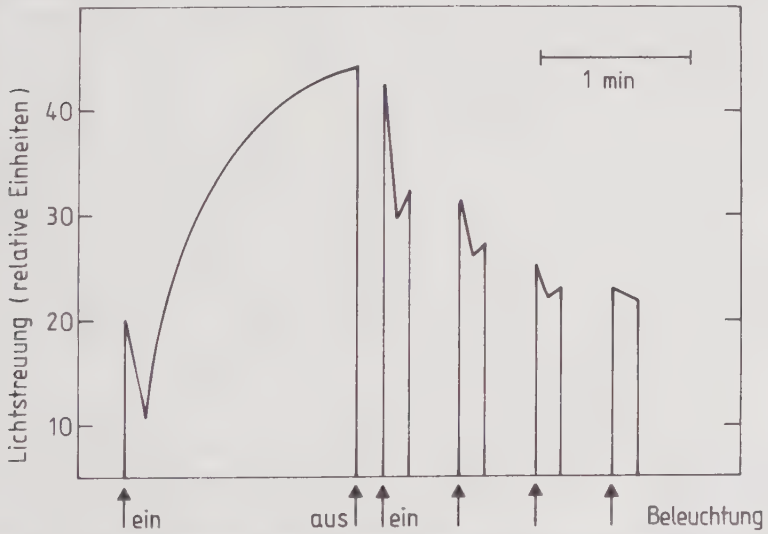


Abb. 70: Die Messung der Lichtstreuung der um einen Protoplasten versammelten Bakterien zeigt die Kinetik der Sauerstoffentwicklung und lichtinduzierte Effekte. Nach jeder Lichtgabe schwimmen die Bakterien zunächst vom Protoplasten weg. Diese Reaktion ist von der Länge und Häufigkeit der vorangegangenen Dunkelphasen abhängig.

Bei hoher Protoplastendichte kam es nach längerer Belichtungszeit wieder zu einer Abnahme bis zur gleichmäßigen Verteilung der Bakterien im Präparat, was auf eine O_2-Sättigung des Präparates schließen läßt.

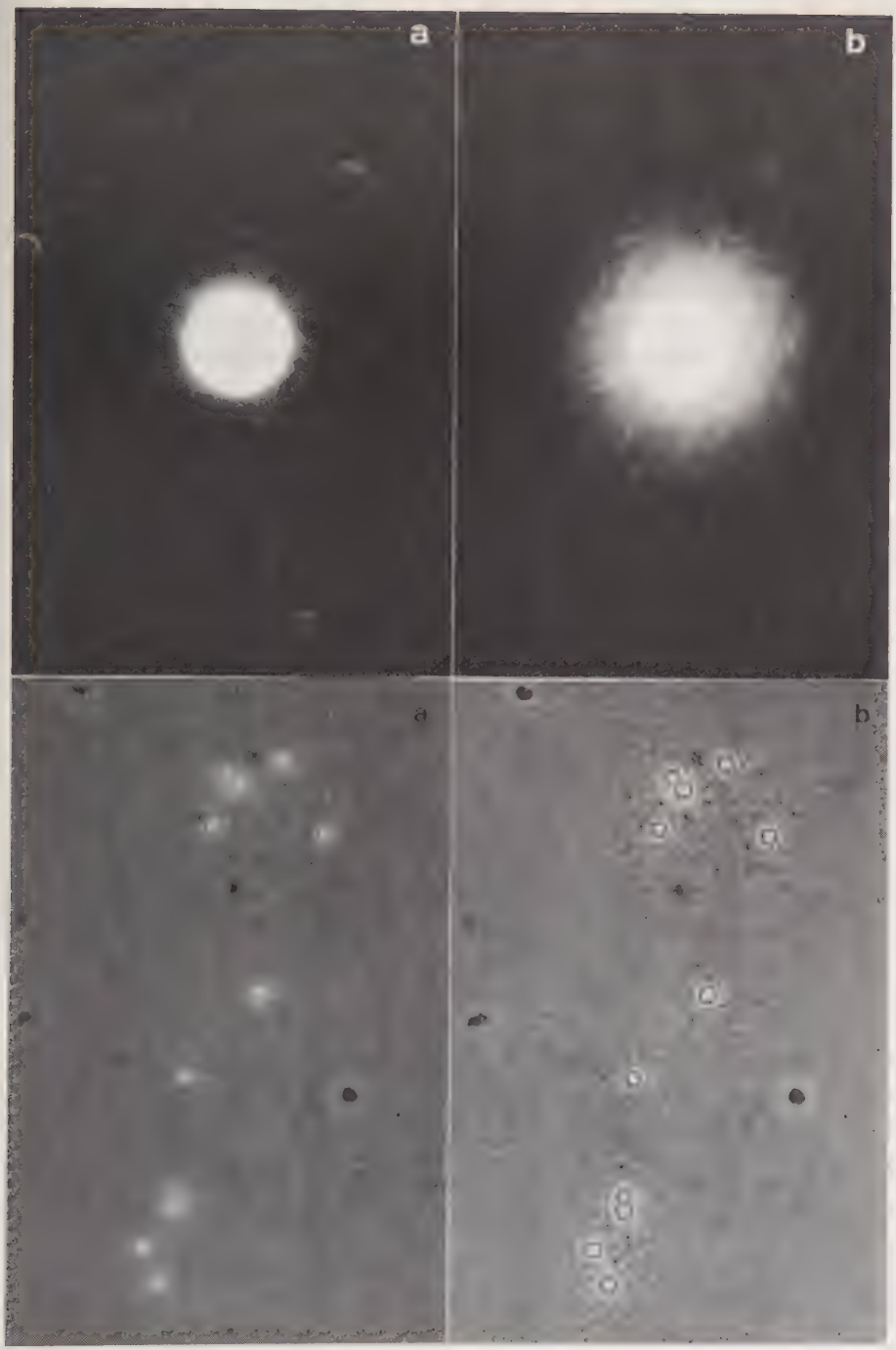
Nach Abschalten der Lichtquelle entfernten sich die Bakterien rasch vom Protoplasten. Nach 5 min. waren nur noch wenige Bakterien am Protoplasten. Nach 15 min. entstand um den Protoplasten, durch dessen respiratorischen Sauerstoffverbrauch, sogar ein bakterienfreier Hof. Diese Versuche konnten beliebig oft wiederholt werden, selbst am nächsten Tag, nach 12 - 24 Stunden Aufbewahrung im Dunkeln bei 20°C, zeigten einige der im Präparat eingeschlossenen Protoplasten noch photosynthetische Aktivität.

Je länger die Dunkelphase zwischen zwei Messungen war, desto langsamer verlief der Anstieg bei erneuter Belichtung. Ab ungefähr 5 Minuten trat ein zweiphasiger Anstieg auf, was sich dadurch äußerte, daß die gemessene Lichtstreuung nach etwa 1 - 1,5 Minuten kurz stagnierte oder sogar abfiel und nach 30 Sekunden erneut bis zum Maximalwert anstieg.

Zugabe von DCPIP (100 µM) zum Präparat ergab einen schnellen Anstieg der Sauerstoffproduktion. Ein biphasischer Verlauf war nicht mehr zu beobachten. Die Reaktion der Bakterien auf die Protoplasten war jetzt allgemein stärker.Sogar isolierte Chloroplasten wurden angeschwommen (Abb. 72). Auf die Vitalität der Pseudomonaden hatte DCPIP keinen erkennbaren Einfluß.

Abb. 71: Protoplast bei Dunkelfeldbeleuchtung
a) nach Dunkelphase (15 min.)
b) 5 min. belichtet; um den Protoplasten hat sich ein Bakterienhof gebildet

Abb. 72: Aus Avena-Protoplasten freigesetzte Chloroplasten. Als Hill-Reagenz wurde 100 µM DCPIP zugegeben.
a) nach Dunkelphase (15 min.)
b) 5 min. belichtet; intakte Chloroplasten werden von den Bakterien angeschwommen. Defekte Chloroplasten sind dunkel gefärbt.


a
b
a
b

3.6.3. Vergleichsmessungen mit der Sauerstoffelektrode

Teilweise wurde mit den gleichen Protoplastensuspensionen wie bei den Bakterientests Parallel-Messungen an der O_2-Elektrode gemacht. Dabei richtete sich das Interesse auf Kinetikmessungen (Induktion der Photosynthese). Nicht so sehr maximale Sauerstoffraten der Protoplasten, sondern Anstieg der Kurven nach verschieden langer Dunkelinkubation und Zugabe von DCPIP war dabei von Bedeutung.

Die mit der O_2-Elektrode gewonnene Kurve hatte methodisch bedingt einen anderen Verlauf als die Bakterienkurve, wies aber die gleichen Merkmale auf (Abb. 73a).

- bei Dunkelzeiten von 3 Minuten und darunter begann die O_2-Produktion sofort mit konstanter Rate. Eine lag-Phase gab es nicht;

- nach längeren Dunkelzeiten flachte die O_2-Rate nach etwa 30 Sekunden ab, erreichte nach 1 - 1,5 Minuten einen Wendepunkt und stieg dann wieder an. Nach 3 - 4 Minuten war eine konstante O_2-Produktion erreicht.

Dieser Verlauf war allerdings nicht immer so deutlich erkennbar und erreichte selbst bei größter Verstärkung nie die Auflösung wie sie mit der Bakterienmethode an einzelnen Protoplasten erzielt wurde, was auch verständlich ist, da hier über die individuellen Unterschiede von ca. 200 000 Protoplasten integriert wurde.

Die Sättigungskurve bei der Bakterienmessung kommt dadurch zustande, daß der O_2-Gradient einem zeitlich begrenzten konstanten Wert zustrebt.

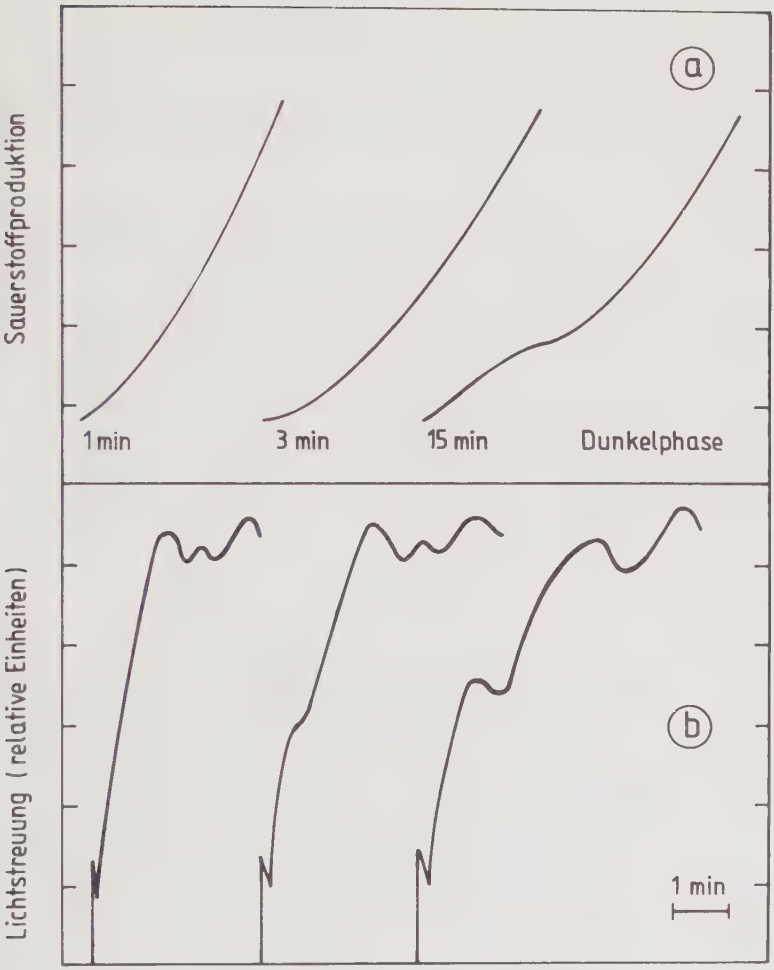


Abb. 73 a: Sauerstoffentwicklung einer Tabak-Protoplastensuspension gemessen mit der O_2-Elektrode nach verschieden langen Dunkelinkubationen.

b: Photometrische Messung der Lichtstreuung von Bakterien um einen Tabakprotoplasten bei Dunkelfeldbeleuchtung.
Mit zunehmender Dauer der Dunkelphase verzögert sich die Sauerstoffproduktion der Protoplasten. Nach einer Minute geht diese für etwa 30 s zurück. Danach steigt sie schnell zum Maximum an.

Nach Zugabe von 10 µl einer 20 mM Stammlösung von DCPIP setzte die O_2-Produktion sofort mit maximaler Rate ein. Allerdings ließ sie schon nach einigen Minuten wieder nach; gleichzeitig verschwand die durch DCPIP hervorgerufene Blaufärbung der Lösung.

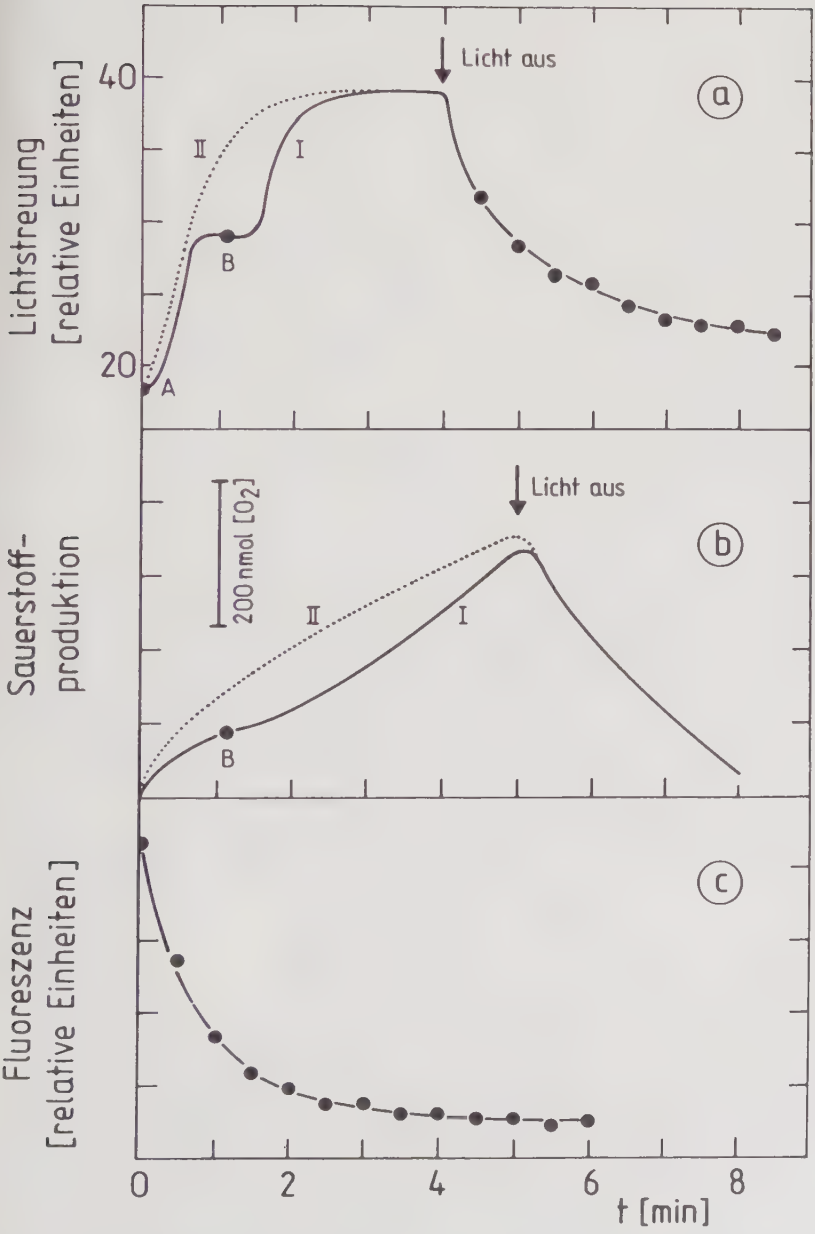
DCPIP ist sowohl Elektronenakzeptor wie Elektronendonator und membranpermeabel. Im oxidierten Zustand ist die Verbindung blau gefärbt. Elektronen, die aus der Wasserspaltung stammen, werden direkt auf diesen oxidierten Farbstoff übertragen; damit gibt es keine Limitierung der Photosyntheserate durch fehlende Elektronenakzeptoren (z. B. NADP). Das reduzierte DCPIP ist farblos und gibt Elektronen an Cytochrom f ab. Diese Elektronen konkurrieren mit denen aus der Wasserspaltung. Dadurch wird die Rate der O_2-Bildung verringert.

Abb. 74: Induktion der Photosynthese

a) Mikrophotometrische Aufzeichnung der um einen einzelnen Tabakprotoplasten bei Dunkelfeldbeleuchtung akkumulierter Bakterien, bestimmt über die Streulichtmessung.
Punkt A: Hintergrundsstreuung, durch den Protoplasten und verbleibende Bakterien hervorgerufen.
I. nach vorausgehender 15 minütiger Dunkelphase ergab sich ein zweiphasiger Anstieg mit einem Abflachen der Kurve nach etwa 1 min. (Punkt B).
Bei Zugabe von DCPIP (100 µM) war dieser Effekt nicht zu beobachten. (II).

b) Vergleichende Messung mit der O_2-Elektrode. Sauerstoffproduktion von Tabakprotoplasten nach Dunkelinkubation (15 min.).
I. ohne DCPIP, nach etwa 1 min. Belichtung ist ein verlangsamter Anstieg zu beobachten (
II. mit DCPIP beginnt die O_2-Produktion sofort mit maximaler Rate.

c) Photometrische Messung der Chlorophyllfluoreszenz eines Tabakprotoplasten nach 15 min. Dunkelphase.
Bei Belichtung (Blaulicht) geht die Fluoreszenz im selben Maße zurück, wie die O_2-Produktion zunimmt.


Lichtstreuung [relative Einheiten]
40
20
Licht aus
a
II
I
B
A
Sauerstoff-produktion
200 nmol [O2]
Licht aus
b
II
I
B
Fluoreszenz [relative Einheiten]
c
0
2
4
6
8
t [min]

3.6.4. Messungen an evakuolisierten Protoplasten

Die Vitalitätsraten, bestimmt mit Glycolat-Oxidase-Test, FDA-Färbung und Bakterien betrugen durchschnittlich etwa 80 % und lagen damit unterhalb der normaler Protoplasten.

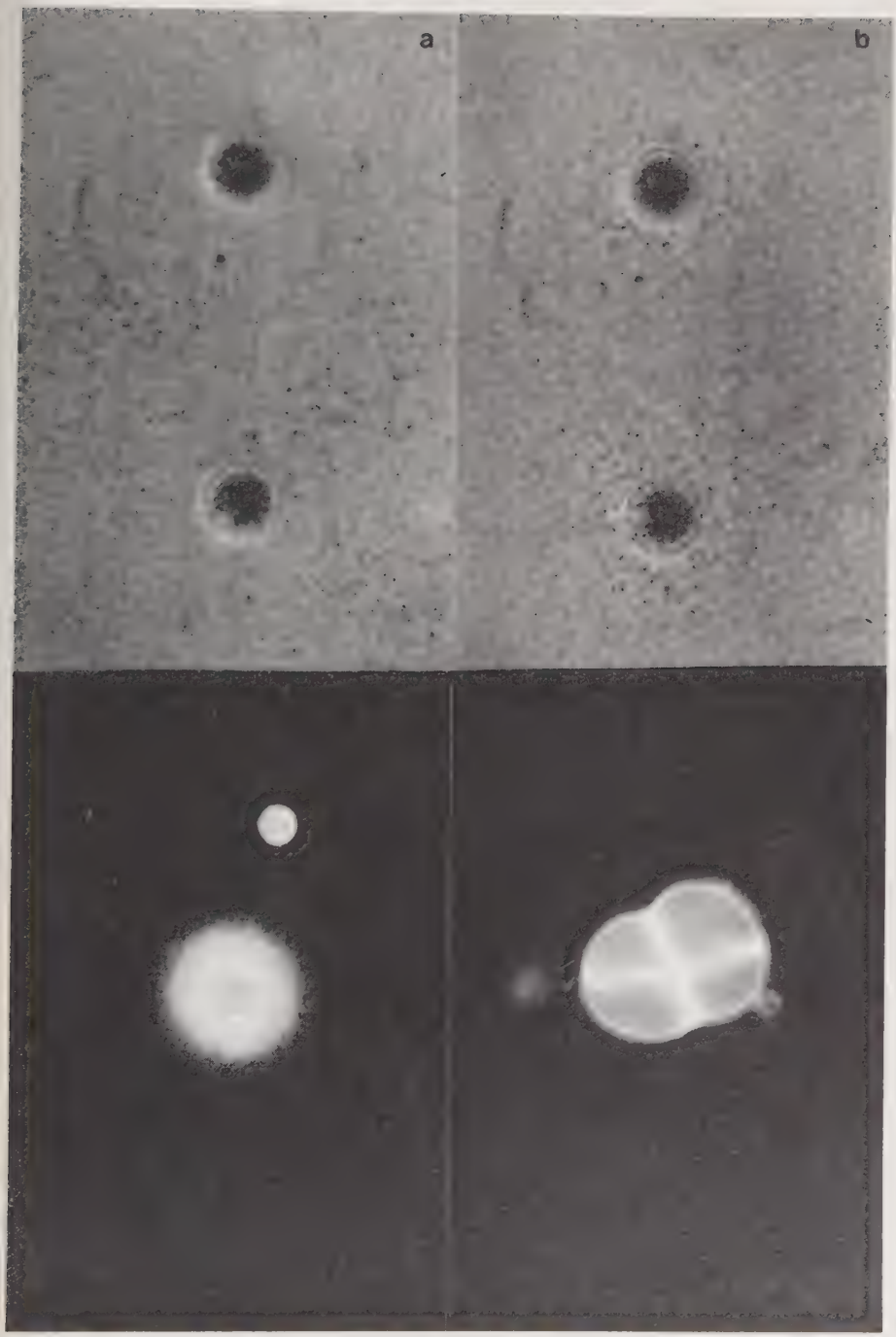
Unmittelbar nach der Evakuolisierung war die Sauerstoffproduktion dieser Protoplasten geringer als am nächsten Tag, was auch an einer deutlich schwächeren Reaktion der Bakterien zu erkennen war. Obwohl die mit Pseudomonas aeruginosa ermittelte Fähigkeit zur Sauerstoffproduktion nach mehreren Tagen abnahm, blieb auch hier die mit FDA bestimmte Intaktheitsrate beinahe unverändert.

Die verminderte Rate der lichtabhängigen O_2-Entwicklung erschwerte Kinetikmessungen. Ein deutlich biphasischer Verlauf konnte nur bei zwei von 14 evakuolisierten Tabakprotoplasten gemessen werden. Ansonsten verhielten sich P(-)- wie P(+)-Protoplasten. Ein signifikanter Unterschied zwischen normalen und evakuolisierten Protoplasten in der Sauerstoffkinetik wurde nicht festgestellt.

Abb. 75: Evakuolisierte Haferprotoplasten
a) nach einer Dunkelphase von 15 min., die Bakterien sind statistisch verteilt.
b) nach 5 min. Belichtung haben sie sich um die beiden Protoplasten versammelt.

Abb. 76: Evaluolisierter Tabakprotoplast bei Dunkelfeldbeleuchtung. Um den Protoplasten hat sich ein Bakterienhof gebildet.

Abb. 77: Nachweis der Regenerationsfähigkeit eines evakuolisierten Tabakprotoplasten durch den Test auf Zellwandbildung und Zellteilung mit Calcofluor White-Färbung.


a
b

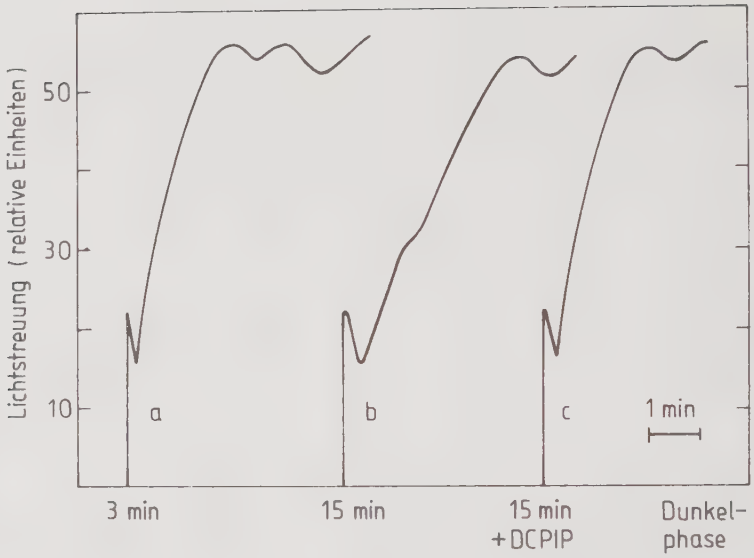


Abb. 78: Sauerstoffkinetik evakuolisierter Tabakprotoplasten einen Tag nach der Evakuolisierung.

Nach Lichtgabe schwimmen die Bakterien zentral vom Protoplasten weg, dadurch nimmt die Lichtstreuung zunächst ab. Nach etwa 30 s nimmt die Dichte der Bakterien-Population um den Protoplasten rasch zu (a).

b) nach vorausgehender 15-minütiger Dunkelphase tritt ein biphasischer Anstieg auf, der bei Präparaten mit DCPIP (c) nicht zu beobachten ist.

Häufig erreicht die Sauerstoffproduktion nicht sofort die Sättigung, sondern schwingt mit abnehmender Amplitude auf den Maximalwert ein.

3.6.5. Messungen an Hybridprotoplasten

Hafer- und Tabakprotoplasten wurden in der Trommel- oder Mäanderkammer elektrisch fusioniert. Die Fusionsausbeute an Zweizellhydriden betrug 10 - 20 %. Der Anteil interspezifischer Hybride war nochmals um Faktor 3 geringer. In der Trommelkammer war die Fusionsrate durch die größere Elektrodenfläche nur etwa halb so groß.

Um fusionierte von unfusionierten Protoplasten unterscheiden zu können, wurden zwei Methoden verwendet:

1. Verwendung von Fluorochromen als "tracer";

2. Fusion von evakuolisierten und vakuolenhaltigen Protoplasten.

Bei der ersten Methode wurden FITC- und RITC-gefärbte Protoplastenpopulationen elektrisch fusioniert, anschließend die gesamte Suspension mit Elektrodenpuffer 1 : 10 verdünnt, und nach einigen Stunden sowie an den darauffolgenden Tagen Vitalitätstests vorgenommen. Messungen an der O_2-Elektrode zeigten wie bei FDA eine stark verminderte Sauerstoffentwicklung (bis zu 80 %) der gefärbten Protoplasten.

Präparate mit Bakterien wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Hybridzellen untersucht (Abb. 79) und diese dann bei Hellfeldbeleuchtung mit Phasenkontrast auf ihre Sauerstoffproduktion getestet (Abb. 80).

Von 95 Hybridzellen aus Haferprotoplasten produzierten einen Tag nach der Fusion noch 83 Sauerstoff; das entspricht einer Vitalitätsrate von 87 %. Diese liegt nur geringfügig unter der Vitalitätsrate gleichalter, unfusionierter Protoplasten. Nach zwei Tagen waren in der Fusionssuspension keine Protoplasten mehr zu finden, die bei entsprechen-

der Filterkombination beide Fluoreszenzfarben zeigten. Verantwortlich dafür ist der Resonanzenergietransfer. Darunter versteht man die Übertragung der absorbierten Energie vom kurzwelligen zum langwelligen Farbstoffmolekül. (Keller et al. 1977, Stegmann et al. 1985).

Da die Emission von FITC (540 nm) und die Absorption von RITC identisch sind, ist Resonanzenergietransfer möglich, wenn die Moleküle genügend dicht beieinander liegen. Das wird offenbar durch die Zytoplasmadurchmischung nach zwei Tagen erreicht.

Ein Vergleich mit der FDA-Färbung konnte nicht erfolgen, da das Fluorescein-Derivat FITC gleiche Fluoreszenzeigenschaften hat wie FDA und somit eine zusätzliche Färbung nicht erkennbar ist.

Auf Grund der geringen O_2-Produktion der gefärbten Protoplasten konnten keine Kinetikmessungen erfolgen.

Abb. 79: FITC (gelb) und RITC (rot) - gefärbte Haferprotoplasten wurden in der Mäanderkammer elektrisch fusioniert und die Suspension einen Tag später mit Bakterien auf photosynthetische Sauerstoffproduktion untersucht.

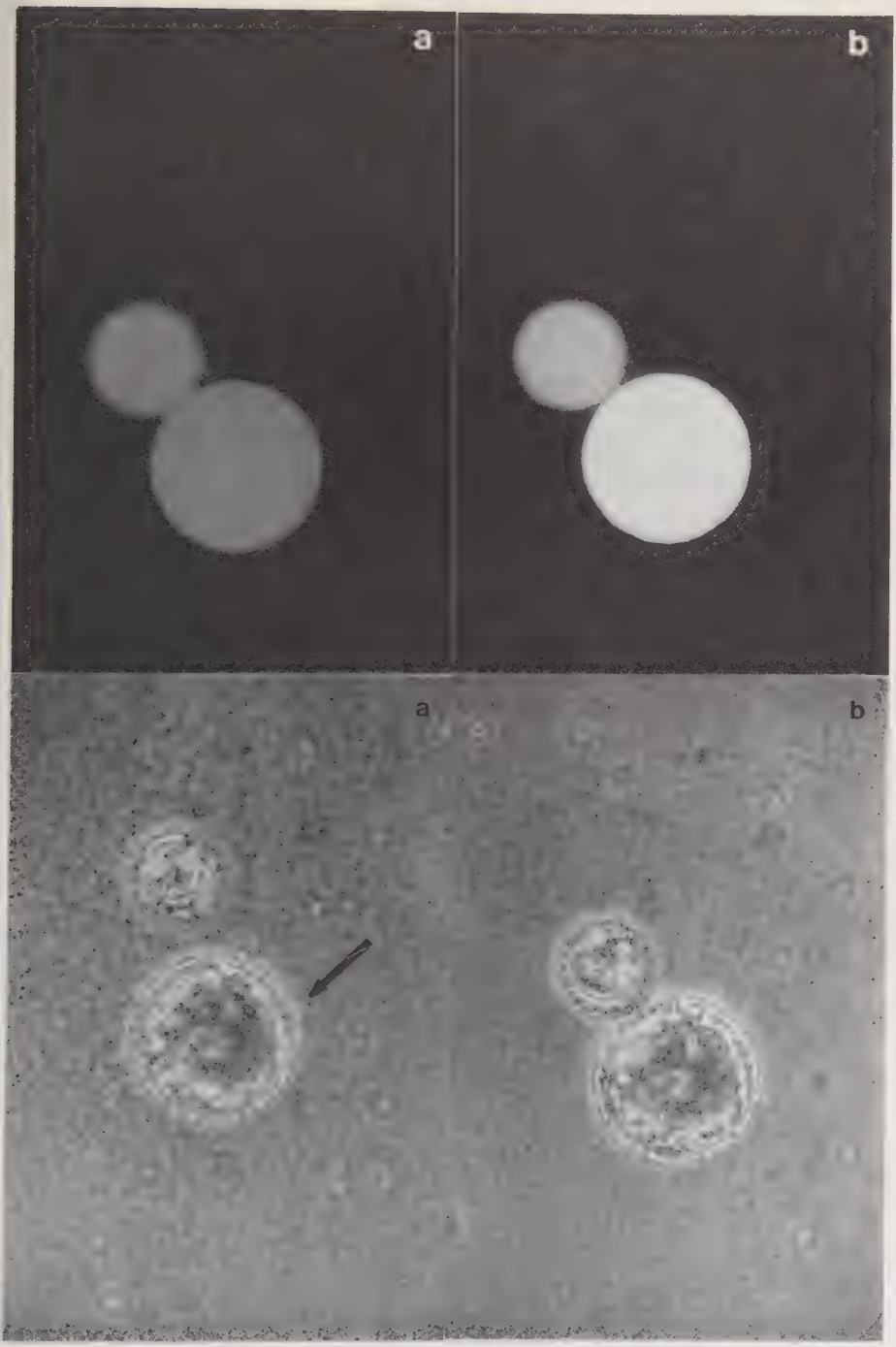
a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der RITC-Emission.

b) Selektive Filterung der gelben FITC-Fluoreszenz. Der große Protoplast zeigt beide Fluoreszenzfarben. Er ist also ein Fusionsprodukt aus mindestens zwei verschieden gefärbten Protoplasten.

Abb. 80: Wie Abb. 79, jedoch Hellfeldbeleuchtung und Phas kontrast-Aufnahme mit Mikroblitz.

a) Bakterientest: unfusionierter und fusionierter (Pfeil) Protoplast entwickeln im Licht Sauerstoff.

b) Kontrollversuch nach Dunkelphase (15 min.): alle Bakterien sind verteilt.


a
b
a
b

Bei der zweiten Methode erfolgte die Identifizierung der Hybride anhand der ungleichmäßigen Chloroplastenverteilung. Der Anteil des evakuolisierten Protoplasten am Fusionsprodukt ist als dunkelgrüner Bereich sichtbar (Abb. 81).

Diese Methode hatte gegenüber der Anfärbung folgende Vorteile:

- keine Toxizität;
- auch Mehrfachfusionen waren sichtbar;
- Selektion der Hybride im Dichtegradienten war möglich (Naton 1986);
- Intaktheit konnte mit FDA überprüft werden;

Die Nachteile waren:

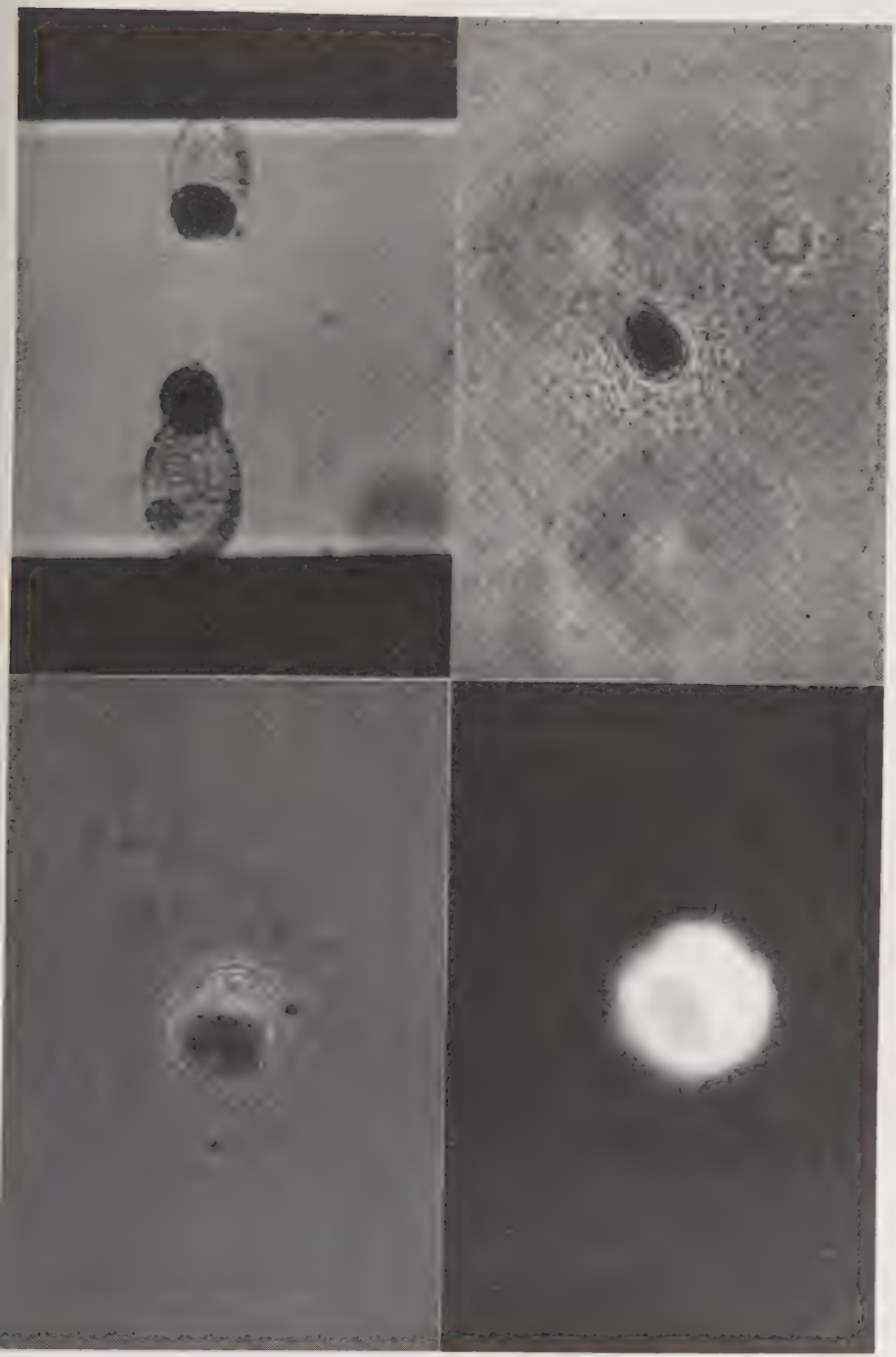
- geringere Fusionsrate auf Grund der unterschiedlichen Größe und spezifischen Dichte der Protoplasten; es fusionierte nur etwa 1/3 der P(+)-P(-)-Paarungen;
- infolge der Zytoplasmadurchmischung waren Hybride meist nach zwei Tagen nicht mehr zu unterscheiden.

Abb. 81: Fusion von normalen mit evakuolisierten Tabakprotoplasten. Der Anteil des evakuolisierten Protoplasten am Fusionsprodukt ist durch die hohe Chloroplastendichte gut zu erkennen.

Abb.82: Fusionsprodukt aus evakuolisierten Tabakprotoplasten 1/2 Stunde nach der Fusion. Das Hybrid ist noch nicht vollständig abgerundet. Wie der Bakterientest zeigt, produziert es im Licht Sauerstoff.

Abb. 83: Fusionprodukt aus einem normalen und einem evakuolisierten Haferprotoplasten 1 Stunde nach Fusion. Die Bakterien sammeln sich hauptsächlich am chloroplastenreichen P(-)-Anteil des Hybrids, offenbar wird hier mehr Sauerstoff abgegeben.

Abb. 84: Intraspezifische Hafer-Hybridzelle aus einem P(+)- und einem P(-)-Protoplasten einen Tag nach der Fusion. Der Anteil der beiden Protoplastentypen ist noch immer zu erkennen. Das Hybrid ist physiologisch intakt, es wird von Bakterien angeschwommen.



Die Lebensfähigkeit dieser Hybride lag einen Tag nach der Fusion zwischen 90 - 100 % beim FDA-Test und um 85 % beim Bakterientest,bezogen auf die im Phasenkontrast intakt aussehenden Fusionsprodukte. Hier zeigte sich nochmals die Empfindlichkeit des Engelmann'schen Versuchs. Die Bakterien sammelten sich mehr an der P(-)-Seite des Hybrids an, da dort die Chloroplastenzahl größer war und der O_2-Austritt hauptsächlich an dieser Stelle erfolgte.

Die meist lange lag-Phase zwischen Belichtung und Anstieg der Sauerstoffproduktion war typisch für Hybridprotoplasten. Bei Aussagen über Stoffwechselleistungen der Protoplasten besonders im Vergleich zwischen verschiedenen Präparaten ist jedoch Vorsicht geboten, da Bakterien- und Protoplastendichte mit eingehen. Innerhalb eines Präparates konnten jedoch halb-quantitative Vergleiche angestellt werden.

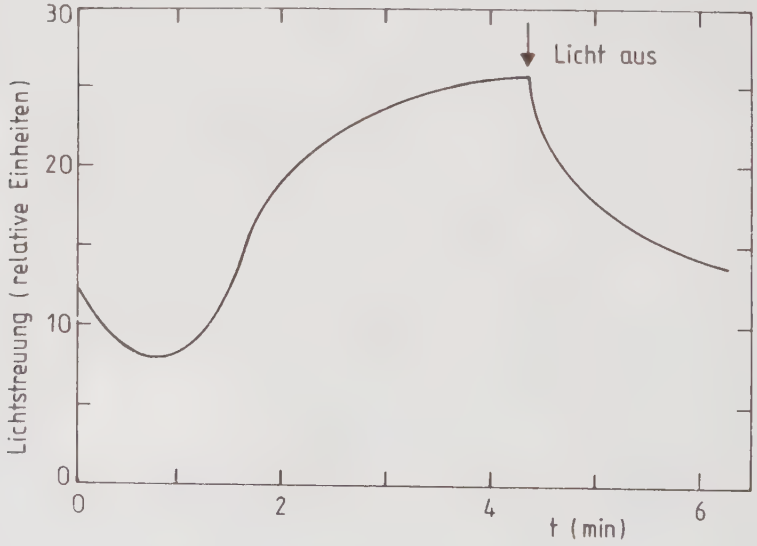


Abb. 85: Kinetik der Sauerstoffentwicklung eines Hybridprotoplasten.

Fusionsprodukte aus einem normalen und einem evakuolisierten Tabakprotoplasten 4 Stunden nach der Fusion. Charakteristisch ist die lange lag-Phase.

3.6.6. Diskussion

Die an einzelnen Protoplasten gewonnenen Kinetikmessungen der Sauerstoffproduktion stimmen mit Untersuchungen zum Phänomen der photosynthetischen Induktion (Kautzky-Effekt) überein. Darunter versteht man das verzögerte Einsetzen der Photosynthese, wenn der Beleuchtung eine längere Dunkelphase vorangeht (Walker 1976). Dieses Phänomen beruht auf der Kopplung von Kohlenstoffassimilation und der Aktivität des photochemischen Apparates. So wird in den ersten 60 Sekunden der Belichtung das gebildete NADPH und ATP in den Chloroplasten akkumuliert (für Avena-Mesophyllprotoplasten siehe Hampp et al. 1985), während die Enzyme für die CO_2-Fixierung noch inaktiv sind (Buchanan 1980). Hohe ATP/ADP- und NADPH/NADP-Verhältnisse im Stroma vermindern den photosynthetischen Elektronentransport und senken dadurch die O_2-Bildung.

Nach der allgemein anerkannten Q-Hypothese von Duysens und Sweers (1963) wird die Energieübertragung von den Chlorophyll a-Molekülen der Antenne auf P680 vom Oxidationszustand des primären Akzeptors von P680, der Substanz Q (Quencher), bestimmt. Sind die Q-Moleküle mehr oxidiert und können sie Elektronen aufnehmen, so ist die O_2-Rate hoch und die Floureszenz gering. Sind die Q-Moleküle aufgrund eines behinderten e-Flusses (NADPH) reduziert, so können sie von P680 keine Elektronen übernehmen und die O_2-Rate ist niedrig. Mit dem Start der CO_2-Fixierung wird NADPH und damit auch Q oxidiert und der Elektronentransport wird nicht länger blockiert. Dies führt zu einer weiteren Zunahme der Sauerstoffproduktion und damit der Bakterienzahl um den Protoplasten.

Im zeitlichen Verlauf stimmen die mit der Bakterienmethode erzielten photometrischen Kurven mit den von Walker & Sivak (1985) gewonnenen Messungen des Gaswechsels und der Chlorophyll a-Fluoreszenz von ganzen Blättern überein.

Wenn die Photosyntheseaktivität (O_2-Produktion) niedrig ist, wird die aufgenommene Lichtmenge wieder in Form von Wärme und Fluoreszenz abgestrahlt. Die Veränderung der Fluoreszenzintensität verhält sich also antiparallel und phasenverschoben (siehe Walker & Sivak 1985) zur Sauerstoffproduktion beziehungsweise der CO_2-Fixierung.

Das induktionsabhängige Zwischenmaximum in der O_2-Produktion verschwindet, wenn der membranpermeable Elektronenakzeptor DCPIP zugegeben wurde. In diesem Fall werden die Elektronen von der Wasserspaltung direkt auf den oxidierten Farbstoff übertragen.

Einige Protoplasten zeigten einen oszillierenden Verlauf der Sauerstoffproduktion mit einer Schwingungsdauer von etwa einer Minute und einer Abklingzeit von etwa 5 Minuten. Ähnliche Messungen wurden auch von Walker & Sivak (1985) an Spinatblättern gemacht. Dieser Einschwingungsvorgang demonstriert die Regulation von Photosynthese und CO_2-Fixierung.

Wesentliche Unterschiede zwischen Hafer- und Tabakprotoplasten traten nicht auf. Ein biphasischer Verlauf der Anstiegskurve konnte zwar bei Tabakprotoplasten öfters gemessen werden, doch liegt dies wahrscheinlich daran, daß zur Messung solcher Nuancen nur Protoplasten mit hoher Sauerstoffrate, wie sie aus Tabak gewonnen werden (siehe 3.1.1.), tauglich sind. Dasselbe gilt für evakuolisierte und Hybridprotoplasten.

Ein bei allen Messungen ständig zu beobachtendes Signal war der Abfall der Streulichtintensität unmittelbar nach dem Einschalten der Mikroskoplampe. Daß dies nicht auf einem Artefakt beruht oder durch eine Lichtreaktion der Pseudomonaden hervorgerufen wird, bestätigen Messungen der an einer Luftblase akkumulierten Bakterien. Dabei

war keine lichtinduzierte Veränderung zu beobachten. Die Streulichtabnahme beruhte auf einem gezielten Wegschwimmen der Bakterien in radialer Richtung. Diese schnelle Reaktion ist kaum auf eine Stoffwechseländerung des Protoplasten zurückzuführen, sondern nur durch einen lichtinduzierten elektrischen Effekt zu erklären. Dafür sprechen zum einen die gerichtete Bewegung der Bakterien im radialen Feld des Protoplasten. Daß Pseudomonas aeruginosa auf elektrische Felder reagiert, indem es nur parallel zu den Feldlinien schwimmt, konnte in 3.2. gezeigt werden.

Zum anderen ist die beim wiederholten Ein- und Ausschalten auftretende Abnahme beziehungsweise das Verschwinden der Reaktion. Die Ursache könnte eine Refraktärphase darstellen, wie sie auch beim Auslösen tierischer Aktionspotentiale auftritt.

Beispiele für solche botanischen Aktionspotentiale sind selten und bis jetzt nur von niederen Pflanzen bekannt. Sie treten spontan auf, können aber auch elektrisch, mechanisch oder durch Licht ausgelöst werden (Bentrup 1985). Von der Meeresalge Acetabularia mediterranea (Schilde 1968) und der Mooralge Eremosphaera viridis (Köhler 1983) sind solche photoelektrischen Effekte bekannt. Bei Acetabularia handelt es sich dabei um eine lichtausgelöste Depolarisierung, die als Lichtabhängigkeit eines transmembranen Reaktionsschrittes im Zyklus einer elektrogenen Pumpe (ATPase) erklärt wird (Gradmann 1978).

Bei starker Bakterienbewegung wurde häufig Rotation der Protoplasten im Uhrzeigersinn beobachtet. Diese gleichgerichtete Drehbewegung kann auf der Wirkung eines vom Protoplasten ausgehenden, endogenen elektrischen Feldes beruhen, auf das die Bakterien mit einer gerichteten Bewegung reagieren. Solche bioelektrischen Felder wurden schon in wachsenden Zellen gefunden (Weisenseel 1984).

4. ALLGEMEINE DISKUSSION

Die ersten Beobachtungen zur Kettenbildung im elektrischen Feld machte Muth (1927) an emulgierten Fettpartikeln. Seit dem Aufkommen von Radar- und Mikrowellengeräten wurden auch zunehmend biologische Objekte zum Gegenstand der Untersuchung, vor allem pathogener Effekte. Liebesny (1939) beobachtete Kettenbildung von Erythrozyten im hochfrequenten Feld. Teixeira-Pinto et al. (1960) untersuchten Euglena, Amöba, Paramecium, Hefe und Bakterien. Pohl (1978) befaßte sich ausführlich mit der Wanderung von Partikeln im inhomogenen Feld und gab ihr den Namen Dielektrophorese.

Krasny-Ergen (1936) erklärte das Phänomen der Kettenbildung durch Dipolinduktion in den Partikeln und deren gegenseitige elektrische Anziehung. Teixeira-Pinto et al. (1960) postulierten als Ursache eine Feldverzerrung durch die Partikel und deren Wanderung in eine Position, in welcher die Feldverzerrung am geringsten ist.

Eine ausführliche Theorie, die auf der gegenseitigen Beeinflussung der induzierten Dipole beruht, lieferten Saito & Schwan (1961), Schwarz et al. (1965) und Pohl (1978).

Trotz detaillierter theoretischer Grundlagen ist es in der Praxis meist schwierig, das Verhalten von Zellen in elektrischen Feldern zu berechnen, da die physikalischen Parameter der Zelle komplex und oft nicht bekannt sind. So wird das Polarisationsspektrum von Zellen durch die elektrischen Eigenschaften von Zellinnerem, Zellmembran, Zellwand und äußerem Medium bestimmt. Erschwerend kommt hinzu, daß in Abhängigkeit von Versuchsdurchführung und Zellart jeweils andere Medien verwendet werden, so daß vergleichende Aussagen kaum möglich sind.

Durch die Anwendung des dielektrophoretischen Effekts zum Sammeln der Zellen bei der Elektrofusion, hat dieser neue Bedeutung gewonnen. Die verwendeten Fusionskammern haben oft ein stark inhomogenes Feld, so daß Berechnungen nicht oder nur mit pauschalen Korrekturfaktoren wie zum Beispiel bei der Laplace-Gleichung möglich sind. Hier hilft die in 3.2.3. vorgestellte Methode der Darstellung von Mikrofeldern weiter. Da die Feldliniendichte proportional der Feldstärke ist, können halbquantitative Aussagen über lokale Feldstärken gemacht werden.

Über das induzierte elektrische Feld im Inneren der Zelle gibt es wenig Anhaltspunkte. Betrachtet man den Protoplasten als Dielektrikum mit der Dielektrizitätskonstante ε so ist das Feld homogen und die Feldstärke geht auf $\frac{1}{\varepsilon}$ zurück. Durch die Permeabilitätsänderung der Membran beim elektrischen Durchbruch kommt es wahrscheinlich zu einem etwas anderen Verlauf der Feldlinien. Dies ist jedoch bei der kurzen Pulszeit nicht sichtbar.

Diskussionen über die Verwendung von Fusionskammern mit homogenem oder inhomogenem Feld beziehungsweise deren schädigende Wirkung durch lokal hohe Feldstärken sind, wie gezeigt, müßig, da die stärkste Inhomogenität von den Zellen selbst hervorgerufen wird. Die Auswahl der Fusionskammer muß sich daher nicht unbedingt nach der Feldcharakteristik richten, sondern kann sich an anderen Anforderungen orientieren.

Die Drahtkammer ist die typische Experimentierkammer, um optimale Fusionsparameter für die jeweilige Zellart zu erarbeiten. Um größere Mengen von Zellen zu fusionieren, eignet sich die Mäander- oder Plattenkammer. Über den Elektrodenabstand, die Suspensionsdichte, die Sammelspannung und die Sammelzeit kann die gewünschte Kettenlänge eingestellt werden.

Die Applikation von AC- Feldern kann zu Vitalitätsverlusten führen. Dies stellten Förster & Emeis (1985) an Hefeprotoplasten fest. Langes Sammeln von Pflanzenprotoplasten führte bei der anschließenden Fusion ebenfalls häufiger zum Platzen der Protoplasten. Aus diesem Grunde ist eine Untersuchung, wie sie in 3.2. für das Schwellenpotential und dessen Abhängigkeit von Sammelzeit und Frequenz für Protoplasten durchgeführt wurde, nötig, um für eine schonende Behandlung optimale Fusionsparameter zu finden.

Da in biologischen Systemen viele Prozesse durch elektrische Felder gesteuert werden, wie potentialabhängige Kanäle in der Membran und Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse der Zelle (Weisenseel 1984), ist die Beeinflussung durch äußere Felder einsichtig.

Das auf Grund der asymmetrischen Farbstoffaufnahme entwickelte Modell zum Mechanismus der Elektropermeabilisierung und Fusion ist von theoretischem und potentiell praktischem Interesse. Aus theoretischer Sicht ist es wichtig, zu verstehen, wie die Durchbruchseigenschaften der benachbarten Membranen von Veränderungen des Zellkontaktes abhängen , wie sich die Membranen gegenseitig beeinflussen und welche Membran konstitutiv diese Defekte formt. Für den praktischen Gebrauch ist diese Färbetechnik geeignet, reversible Poren kontrollierbarer Größe und Lebensdauer in der Membran zu lokalisieren.

Mit der Kenntnis der asymmetrischen Porenbildung ist es vielleicht möglich, eine Technik zu entwickeln, bei der die geladenen Moleküle, eventuell durch Elektrophorese, an der Porenstelle angereichert und dann durch den Puls gezielt eingeschleust werden.

Unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus bietet die feldinduzierte Einschleusung von membranimpermeablen Substanzen in das Zellinnere die Möglichkeit, das Funk-

tionsspektrum der Zelle zu manipulieren. Erste Erfolge wie Gentransfer (Neumann et al. 1982), Einbringung von RNA (Nishiguchi et al. 1986) und DNA-Transfektion (Stopper et. al. 1986) wurden bereits erzielt, jedoch sind die Transfektionsraten bisher gering.

Eine andere Möglichkeit der Zellmanipulation bietet die Fusion von Zellen untereinander und mit künstlichen Vesikeln. Die Untersuchung zur Membrandurchbruchspannung könnte hier Aufschluß über die Möglichkeiten der Fusion verschiedener Systeme geben. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Radiusabhängigkeit und die Anzahl der Membranen.

Das Problem der Selektion von Hybriden wurde durch die Verwendung von normalen und vakuolenfreien Protoplasten gelöst. Zum einen sind die Fusionsprodukte bis zu zwei Tagen nach der Fusion lichtmikroskopisch zu unterscheiden, zum anderen lassen sie sich über einen Dichtegradienten abtrennen (Naton 1986). Unbefriedigend ist allerdings die Ausbeute an interspezifischen Hybriden. Die Ursache ist die unterschiedliche Dichte der Fusionspartner. Das Fusionsmedium kann nur für einen Protoplastentyp isopyknisch eingestellt werden, der andere flottiert oder sedimentiert. Beim Anlegen einer Wechselspannung sammeln sich zuerst die schwebenden Protoplasten. Die sich bildenden Ketten haben somit nur wenige P(+)-P(-)-Paarungen. Eine Lösung dieses Problems könnte die Fusion von Protoplasten unter µg-Bedingungen bieten.

Von besonderer Wichtigkeit ist die Integrität der Fusionsprodukte. Da es sich hierbei nur um wenige Zellen handelt, die zudem noch mit anderen vermischt sind, mußten Techniken gefunden werden, die es ermöglichten, die Vitalität einzelner Protoplasten zu bestimmen und für einen routinemäßigen Gebrauch geeignet sind. Färbemethoden zeigten, besonders bei vorgeschädigten, beziehungsweise durch Evakuolisierung und Fusion manipulierten, Protoplasten, deutliche Mängel. Als sensitiver, physiologischer Parameter

erwies sich die lichtabhängige O_2-Produktion. Mit der Bakterienmethode konnten nicht nur einzelne Protoplasten auf ihre Intaktheit getestet werden, sondern geringste Mengen an erzeugtem Sauerstoff erkannt und Zellorganellen auf ihre assimilatorische Wirkung geprüft werden. Diese Methode bietet sich vor allem dann an, wenn, wie bei Fusionsprodukten oder spezialisierten Zellen (Stomata, Gelenkzellen), nur wenige Protoplasten zur Verfügung stehen.

Die Reaktion der Bakterien ist so schnell, daß plötzliche O_2-Änderungen bei Licht-Dunkel-Wechsel ohne merklichen Zeitverlust angezeigt werden.

Ihre Empfindlichkeit ist so groß, daß die von einem einzigen Chloroplast abgegebene Sauerstoffmenge ($\approx$0,01 fmol/min) noch bequem nachgewiesen werden kann.

Wie die Reaktion der Bakterien auf chemische und elektrische Reize zeigt, ist diese Methode in vielfacher Weise anwendbar und kann für bestimmte Ziele und Zwecke angepaßt werden. Es kommt nur darauf an, für alle Fälle geeignete Bakterien zu finden. Ein neuartiges und vielversprechendes Experimentierfeld bilden hier Untersuchungen bioelektrischer Felder, sensorische Prozesse, Aktionspotentiale und damit verbundene zelluläre Transportvorgänge.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An Mesophyllprotoplasten von Avena sativa L., Nicotiana tabacum L. und Vicia faba L. wurden im Hinblick auf die Anwendung der Elektrofusion und Elektropermeabilisierung Prozesse untersucht, die in der Membran durch externe, elektrische Felder induziert werden. Damit wurden sowohl Grundlagen zum physikalischen Verständnis der Pflanzenzelle erbracht, als auch potentielle Möglichkeiten und Anwendungen dieser Methoden für die Zellbiologie und Pflanzenzüchtung aufgezeigt.

1. Durch Ultrazentrifugation in einem Percoll-Gradienten wurden vakuolenfreie Protoplasten, Pseudovakuolen und Vakuolen gewonnen. Die evakuolisierten Protoplasten unterscheiden sich von den Ausgangsprotoplasten durch das Fehlen der zentralen Vakuole (und damit eines Membransystems), ihre Größe und ihre spezifische Dichte. Die Pseudovakuolen sind von einer intakten Plasmalemmamembran und einem Rest cytosolischer Substanz umgebene Vakuolen.

2. Mit Hilfe von Bakterien und Polystyrolkügelchen wurden Feldeffekte wie positive und negative Dielektrophorese untersucht und dieses unterschiedliche Verhalten für die Darstellung elektrischer Felder beim Sammeln von Protoplasten in einer Fusionskammer genützt.

3. Die verschiedenen Protoplasten und die Produkte aus der Evakuolisierung wurden elektrisch fusioniert und über die Fusionsparameter die Durchbruchspannung einer biologischen Membran bestimmt. Die Befunde sind für das Auffinden optimaler Bedingungen zur elektrisch induzierten Fusion und für das Einschleusen von impermeablen Substanzen in die Zelle von Bedeutung.

4. Die durch einen kurzen elektrischen Puls hoher Intensität gebildeten Poren in der Membran suspendierter Protoplasten wurden über den Stoffaustausch mit dem Außenmedium, durch Freisetzung von Chloroplasten und die Chemotaxis von Bakterien auf Zellinhaltsstoffe nachgewiesen. Als Indikator für die elektrisch induzierte Aufnahme wurden membranimpermeable Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Mit allen drei Methoden wurde gezeigt, daß der Membrandurchbruch asymmetrisch, nämlich nur an der zur Anode gerichteten Membranseite auftritt. Die Interpretation der asymmetrischen Porenbildung führte zu einer veränderten Modellvorstellung über den Mechanismus der Elektrofusion.

5. Verschiedene Vitalitätsmarker wurden auf ihre Eignung und physiologische Relevanz untersucht. Mit aerotaktischen Bakterien wurde die lichtabhängige O_2-Entwicklung einzelner Protoplasten, Miniprotoplasten und Fusionsprodukte nachgewiesen und als physiologisches Intaktheitskriterium bewertet. Ein Vergleich mit Färbemethoden verdeutlichte die Diskrepanz zwischen struktureller Unversehrtheit und physiologischer Aktivität.

6. Photometrische Messung der Lichtstreuung von Bakterien im Dunkelfeldmikroskop ermöglichte eine halbquantitative Analyse der photosynthetischen Sauerstoffproduktion einzelner Protoplasten. Die kinetische Darstellung zeigte nach längerer Dunkelphase einen biphasischen Verlauf der O_2-Entwicklung, der auf die photosynthetische Induktion zurückzuführen ist.

7. Protoplasten reagieren möglicherweise auf einen Lichtreiz durch Änderung ihres Membranpotentials beziehungsweise Bildung eines Aktionspotentials. Eine derartige Änderung des endogenen Feldes wird offensichtlich durch Bakterien wahrgenommen und kann photometrisch gemessen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ABIDOR, I.G., V. ARAKELYAN, L. CHERNOMORDIK, Y. CHIZMADZHEV, V. PASTUSHENKO, U. TARASEVICH (1979): Electric breakdown of bilayer membranes. The main experimental facts and their qualitative discussion. Bioelectrochem. Bioenerg. **6**: 37-52

ARNOLD, W.M., U. ZIMMERMANN (1982): Rotating-field-induced rotation and measurement of the membrane capacitance of single mesophyll cells of Avena sativa. Z. Naturforschung **37c**: 908-915

ARNON, D.J. (1949): Copper enzymes in isoleted chloroplasts. Phenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. **24**: 1-15

BEIER, H., G. BRUENING (1975): The use of an abrasive in the isolation of cowpea leaf protoplasts which support the multiplication of cowpea mosaic virus. Virology **64**: 272-276

BENTRUP, F.-W. (1985): Botanische Elektrophysiologie. Naturwissenschaften **72**: 169-179

BENZ, R., F. BECKERS, U. ZIMMERMANN (1979): Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: A charge-pulse relaxation study. J. Membr. Biol. **48**: 181-204

BORNMAN, J.F., C.H. BORNMAN, L.O. BJÖRN (1982): Effects of ultraviolet radiation on viability of isolated Beta vulgaris and Hordeum vulgare protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. **105**: 297-306

BORNMAN, J.F., C.H. BORNMAN (1983): Protoplast viability a relative concept. In: Protoplasts 1983 - Poster Proceedings; 6th Int. Protoplast Symp. Basel, S. 208-209, Verlag Birkhäuser, Basel

BRUNING, J.W. (1982): Präparations- und Färbetechnik zur photometrischen Auswertung des Lymphozytotoxizitätstest. Leitz Mitteilungen **64**: 2-8

BUCHANAN, B.B. (1980): Role of light in the regulation of chloroplast enzymes.
Annu. Rev. Plant Physiol. **31**: 341-374

CLAUS, D., P. Lack, B. NEU (1983): Katalog der Stämme.
Deutsche Sammlung der Mikroorganismen, Göttingen

COCKING, E.C. (1960): Isolation of plant protoplasts by cell wall degrading enzymes. Nature **187**: 962-967

COSTER, H.G.L., U. ZIMMERMANN (1975): The mechanism of electrical breakdown in the membranes of Valonia utricularis. J. Membr. Biol. **22**: 73-90

CROSS, A.S. (1985): Evolving epidermiology of Pseudomonas aeruginosa infections.
Eur. J. Clin. Microbiol. **4**: 156-159

DALE, P.J. (1983): Protoplast culture and plant regeneration of cereals and other recalcitrant crops.
In: Protoplasts 1983 - Lecture Proceedings; 6th Int. Protoplast Symp. Basel, S. 31-41
Verlag Birkhäuser, Basel

DE FILIPPIS, L.F., R. HAMPP, H. ZIEGLER (1980): Protoplasts as a mean of studying chloroplast development in vitro. Plant Physiol. **66**: 1-7

DELIEU, T., WALKER, D.A. (1972): An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. New Phytol. **71**: 201-225

DIMITROV, D.S. (1984): Electric field-induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: a thin viscoelastic modell. J. Membr. Biol. **78**: 53-60

DUYSENS, L.N.M., H.E. SWEERS (1963): Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: Jap. Soc. Plant Physiol. S. 353-372, ed. Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. University of Tokyo, Tokyo,

EDWARDS, G.E., S.P. ROBINSON, N.J.C. TYLER, D.A. WALKER (1978): Photosynthesis by isolated protoplast extracts and chloroplasts of wheat.
Plant Physiol. **62**: 313-319

ENGELMANN, T.W. (1881): Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und thierischer Organismen. Bot. Zeitg. **28**: 441-448

ENGELMANN, T.W. (1882): Ueber Sauerstoffausscheidung von Pflanzenzellen im Mikrospektrum. Bot. Zeitg. **26**: 419-434

ERATH, F. (1986): Isolierung und Charakterisierung von Protoplasten aus dem Extensor des Laminargelenkes und dem Mesophyll des Primärblattes von Phaseolus coccineus. K^+-induzierte Volumenvergrößerung bei Extensor-Protoplasten. Diplomarbeit, Fak. Biologie, Universität Tübingen

EVANS, P.K.; A.G. KEATES, E.C. COCKING (1972): Isolation of protoplasts from cereal leaves. Planta **104**: 178-181

FALK, R.H., C.R. STOCKING (1976): Plant membranes. In: Transport in Plants III, S. 3-40, ed. C.R. STOCKING, U. HEBER, Springer Verlag, Berlin

FARKAS, D.L., R. KORENSTEIN, S. MALKIN (1980): Electroselection in the photosynthetic membrane: Polarized luminescence induced by an external electric field. FEBS Lett. **120**: 236-242

FÖRSTER, E., C.C. EMEIS (1985): Quantitative studies on the viability of yeast protoplasts following dielectrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. **26**: 65-69

FÜREDI, A.A., R.C. VALENTINE (1962): Factors involved in the orientation of microscopic particles in suspensions influenced by radio frequency fields. Biochem. Biophys. Acta **56**: 33

GAFF, D.F., OKONG O-OGOLA (1971): The use of non-permeating pigments for testing survival of cells. J. Exp. Bot. **22**: 756-758

GALBRAITH, D.W. (1984): Selection of somatic hybrid cells by fluorescence-activated cell sorting. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants, **1**: 433-447, ed. I VASIL, Academic Press Inc.

GALBRAITH, D.W., T.J. MAUCH (1980): Identification and fusion of plant protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. **98**: 129-140

GOLLER, M., R. HAMPP, H. ZIEGLER (1982): Regulation of the cytosolic adenylate ratio as determined by rapid fractionation of mesophyll protoplasts of oat. Planta **156**: 255-263

GRADMANN, D. (1978): Green light (550nm) inhibits electronic Cl^- pump in the Acetabularia membrane by permeability increase for the carrier ion. J. Membr. Biol. **44**: 1-24

GRIESBACH, R.J., K.C. SINK (1983): Evacuolation of mesophyll protoplasts. Plant Sci. Lett. **30**: 297-301

HAGER, A., R. HAMPP, W. MEHRLE (1986): Mechanism of growth induction by ester compounds. Studies with segments and protoplasts of oat coleoptiles. In: Plant growth substances 1985, S.284-292, ed. M. BOPP, Springer-Verlag, Berlin

HAMPP, R., H. ZIEGLER (1980): On the use of Avena protoplasts to study chloroplast development. Planta **147**: 485-494

HAMPP, R., M. GOLLER, H. FÜLLGRAF, I. EBERLE (1985): Pyridine and adenine nucleotide status, and pool sizes of a range of metabolites in chloroplasts mitochondria and the cytosol/vakuole of Avena meophyll protoplasts during dark/light transition: effect of pyridoxal phosphate. Plant Cell Physiol. **26**: 99-108

HURLEY, J. (1970): Sizing particles with a coulter counter. Biophys. J. **10**: 74-79

JELTSCH, E., U. ZIMMERMANN (1979): Particles in a homogeneous electrical field: A model for the electrical breakdown of living cells in a coulter counter. Bioelectrochem. Bioenerg **6**: 349-384

KELLER, P.M., S. PERSON, W. SNIPES (1977): A fluorescence enhancement assay of cell fusion. J. Cell Sci. **28**: 167-177

KIMURA, Y., A. IKEGAMY (1985): Local dielectric properties around polar region of lipid bilayer membranes. J. Membr. Biol. **85**: 225-231

KNIGHT, D.E. (1981): Rendering cells permeable by exposure to electric fields. In: Techniques in cellular physiology **113**: 1-20, Elsevier, Holland

KÖHLER, K., H.J. GEISWEID, W. SIMONIS, W. URBACH (1983): Changes in membrane potential and resistance caused by transient increase of potassium conductance in the unicellular green alga Eremosphaera viridis. Planta **159**: 165-171

KOOP, H.-U., H.-G. SCHWEIGER (1985): Regeneration of plants after electrofusion of selected pairs of protoplasts. Europ. J. Cell Biol. **39**: 46-49

KORENSTEIN, R., D.L. FARKAS, S. MALKIN (1984): Reversible electrical breakdown of swollen thylakoid membrane vesicles. Bioelectrochem. Bioenerg. **13**: 191-197

KRASNY-ERGEN, W. (1936): Nicht-thermische Wirkungen elektrischer Schwingungen auf Kolloide. Hochfreq. Techn. Elektroak. **48**: 126-133

KRAUSE, G.H., E. WEIS (1984): Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res. **5**: 139-157

LARKIN, P.J. (1976): Purification and viability determination of plant protoplasts. Planta **128**: 213-216

LAZAR, G.B. (1983): Recent development in plant protoplast fusion and selection technology. In: Protoplasts 1983 - Lecture Proceedings; 6th Int. Protoplast Symp. Basel, S. 61-67, Birkhäuser-Verlag Basel

LEEGOOD, R.C., D.A. WALKER (1983): Chloroplasts. In: Isolation of membranes and organelles from plant cells; ed. J.L. HALL, A.L. MOORE, S. 185-210, Academic Press, New York

LIEBESNY, P. (1939): Athermic short wave therapy. Arch. Phys. Therapy **19**: 736-740

LÖRZ, H. (1984): Enucleation of protoplasts: Preparation of cytoplasts and miniprotoplasts, cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, New York

MUTH, E. (1927): Über die Erscheinung der Perlschnurkettenbidung von Emulsionspartikelchen unter Einwirkung eines Wechselfedes. Kolloid Z. **41**: 97-102

NAGATA, T., I. TAKEBE (1970): Cell wall regeneration and division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. Planta **92**: 301-308

NAGATA, T., G. MELCHERS (1978): Surface charges of protoplasts and their signnificance in cell-cell interaction. Planta **142**: 235-238

NATON, B. (1986): Erarbeitung einer Methodik zur Trennung unfusionierter und elektrisch fusionierter Protoplasten in großem Maßstab. Diplomarbeit, Fak. Biologie, Universität Tübingen

NEUMANN, E., M. SCHÄFER-RIDDER, Y. WANG, P.H. HOFSCHNEIDER (1982): Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. **1**: 841-845

NISHIMURA, M., R. DOUCE, T. AKAZAWA (1985): A simple method for estimating intactness of spinach leaf protoplasts by glycolate oxidase assay. Plant physiol. **78**: 343-346

OKYAMA, K., J.P. NITSCH (1972): Flowering haploid plants obtained from protoplasts of tobacco leaves. Plant Cell Physiol. **13**: 229-236

OTSUKI, Y., I. TAKEBE: (1969): Isolation of intact mesophyll cells and their protoplasts from higher plants. Plant Cell Physiol. **10**: 917-921

PFEFFER, W. (1987): Pflanzenphysiologie Band I, 2. Aufl. S. 325-338, Verlag W. Engelmann, Leipzig

PILWAT, G., R. HAMPP, U. ZIMMERMANN (1980): Electrical field effects induced in membranes of developing chloroplasts. Planta **147**: 396-404

POHL, H.A. (1978): Dielectrophoresis
Cambridge University Press, Cambridge

POWER J.B., E.C. COCKING (1970): Isolation of leaf protoplasts. Macromolecule uptake and growth substance responce. Exp. Biol. **21**: 64-70

RACUSEN, R.H., A.M. KINNERSLEY, A.W. GALSTON (1977): Osmotically induced changed charges in electrical properties of plant protoplast membranes. Sciece **198**: 405-407

RUBINSTEIN, B. (1978): Use of lipophilic cations to measure the membrane potential of oat leaf protoplasts. Plant Physiol. **62**: 927-929

SAITO, M., H.P. SCHWAN (1961): Biological effects of microwave radiation.
Plenum Publishing Corp. S. 85-97, New York

SALHANI, N., H. SCHNABL, G. KÜPPERS, U. ZIMMERMANN (1982): The hydraulic conductivity as a criterion for the membrane integrity of protoplasts fused by an electric field pulse. Planta **155**: 140-145

SCHILDE, C. (1968): Schnelle photoelektrische Effekte der Alge Acetabularia. Z. Naturforsch. **23**: 1369-1376

SCHNABL, H. (1981): The compartmentation of carboxylating and decarboxylating enzymes in guard cell protoplasts. Planta **152**: 307-313

SCHOPFER, P. (1970): Experimente zur Pflanzenphysiologie
Verlag Rombach, Freiburg

SCHWAN, H.P., L.D. SHER (1969): Alternating-current field-induced forces and their biological implications. J. Electrochem. Soc. **116**: 22C-26C

SCHWARZ, G., M. SAITO, H.P. SCHWAN (1965): On the orientation of nonspherical particles in an alternating electrical field. J. Chem. Phys. **43**: 3562-3569

SEITZ, H.U., G. RICHTER (1970): Isolierung und Charakterisierung schnell markierter, hochmolekularer RNS aus frei suspendierten Kalluszellen der Petersilie (Petrosilium sativum). Planta **92**: 309-326

SENDA, M., I. TAKEDA, S. ABE, T. NAKAMURA (1979): Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. Plant Cell Physiol. **20**: 1441-1443

SHER, L.D., E. KRESH, H.P. SCHWAN (1970): On the possibility of nontheremal biological effects of pulsed electromagnetic radiation. Biophys. J. **10**: 970-979

SMITH, B.A., M.L. REIDER, J.S. FLETCHER (1982): Relationship between vital staining and subculture growth during senescence of plant tissue cultures. Plant Physiol. **70**: 1228-1230

STEGMANN, T., D. HOEKSTRA, G. SCHERPHOF, J. WILSCHUT (1985): Kinetics of pH-dependent fusion between influenza virus and liposomes. Biochem. **24**: 3107-3113

STEINGRABER, M. (1985): Bestimmung cytosolischer Metabolitpools durch Membranfilter-Fraktionierung evakuolisierter Avena-Mesophyllprotoplasten. Diplomarbeit, Fak. Biologie, Universität Tübingen

STOICHEVA, N., I. TSONEVA, D.S. DIMITROV (1985):Protoplast dielectrophoresis in axisymmetric fields. Z. Naturforsch. **40c**: 735-739

STOICHEVA, N., D.S. DIMITROV (1986): Dielectrophoresis of single protoplasts: Effects of increased conductivity caused by calcium ions. Studia Biophysica **111**: 17-21

STOPPER, H., U. ZIMMERMANN, E. WECKER (1986): High yields of DNA-transfer into mouse L-cells by electropermeabilization. Z. Naturforsch. **40c**: 929-932

SUGAR, I.P., E. NEUMANN (1984): Stochastic modell for electric field-induced membrane pores - electroporation. Biophys. Chem. **19**: 211-225

TAKASHIMA, S., H.P. SCHWAN (1985): Alignment of microscopic particles in electric fields and its biological implications. Biophys. J. **47**: 513-518

TEIXEIRA-PINTO, A.A., L.L. NEJELSKI, J.L. CUTLER, J.H. HELLER (1960): The behavior of unicellular organisms in an electromagnetic field. Exp. Cell Res. **20**: 548-564

THOMAS, E., P.J. KING, I. POTRYKUS (1979): Improvement of crop plants via single cells in vitro - an assessment. Z. Pflanzenzüchtg. **82**: 1-30

VAN DER VALK, H.C.P.M. (1984): Determination of proteases in isolated washed protoplasts: Inactivation of proteases in cell wall-degrading enzyme mixtures used in protoplast isolation. Plant Sci. Lett. **36**: 201-204

VERHOEK-KÖHLER, B., R. HAMPP, H. ZIEGLER, U. ZIMMERMANN (1983): Electro-fusion of mesophyll protoplasts of Avena sativa. Planta **158**: 199-201

VERHOEK-KÖHLER, B. (1984): Erarbeitung biochemischer Parameter zur Bestimmung der physiologischen Integrität von Hybridzellen nach elektrisch induzierter Fusion. Dissertation, Techn. Universität München

VIENKEN, J., E. JELTSCH, U. ZIMMERMANN (1978): Penetration and entrapment of large particles in erythrocytes by electrical breakdown techniques. Europ. J. Cell Biol. **17**: 182-196

VIENKEN, J., U. ZIMMERMANN, R. GANSER, R. HAMPP (1983): Vesicle formation during electrofusion of mesophyll protoplasts of Kalanchoe daigremontiana. Planta **157**: 331-335

WALKER, D.A. (1976): Photosynthetic induction. In: Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism, ed. G. AKOYUNOGLOU, S. 189-202 Balaban Intern. Science Services, Philadelphia

WALKER, D.A., M.N. SIVAK)1985): In vivo chlorophyll a fluorescence transients associated with enhanges in the CO_2 content of the gas-phase. In: Regulation of carbon partitioning in photosynthetic tissue, ed. R.L. HEATH, J. PREISS, S. 93-108, Proceedings of the eight annual symposium in plant physiology 1985

WARING, M.J. (1966): Structural requirements for the binding of ethidium to nucleic acids. Biochim. Biophys. Acta **114**: 234-244

WEISENSEEL, M.H. (1984): Bioelektrische Ströme. Umschau **9**: 283-285

WIDHOLM, J.M. (1972): The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Techn. **47**: 189-194

WIRTZ, W., M. STITT, H.W. HELDT (1980): Enzymic determination of metabolites in the subcellular compartments of spinach protoplasts. Plant Physiol. **66**: 187-193

ZIMMERMANN, U., G. PILWAT, F. RIEMANN (1974): Dielectric breakdown of cell membranes. Biophys. J. **14**: 881-899

ZIMMERMANN, U., G. PILWAT (1976): Organspezifische Applikation von aktiven Substanzen über zelluläre Trägersysteme. Z. Naturforschung **31c**: 732

ZIMMERMANN, U., G. PILWAT, F. BECKERS, F. RIEMANN (1976): Effects of external electric fields on cell membranes. Bioelectrochem. Bioenerg. **3**: 58-83

ZIMMERMANN, U., G. PIWAT (1978): The relevance of electric field induced changes in the membrane structure to basic membrane research and clinical therapeutics and diagnostics. In: Abstracts of the sixth intern. Biophysics Congress, S. 140, Kyoto, Japan

ZIMMERMANN, U., J. VIENKEN, G. PILWAT (1980): Development of drug carrier systems: Electrical field induced effects in cell membranes. Bioelectrochem. Bioenerg. **7**: 553-574

ZIMMERMANN, U., P. SCHEURICH (1981): High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta **151**: 26-32

ZIMMERMANN, U., P. SCHEURICH, G. PILWAT, R. BENZ (1981): Zellen mit manipulierten Funktionen: Neue Perspektiven für Zellbiologie, Medizin und Technik. Angew. Chemie **93**: 332-351

ZIMMERMANN, U. (1982): Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim. Biophys. Acta **694**: 227-277

ZIMMERMANN, U., J. VIENKEN (1982): Electric field induced cell-to-cell fusion. J. Membr. Biol. **67**: 165-182

ZIMMERMANN, U., G. KÜPPERS, N. SALHANI (1982): Electric field-induced release of chloroplasts from plant protoplasts. Naturwissenschaften **69**: 451-452

ZIMMERMANN, U., J. VIENKEN (1984): Electrofusion of cells. In: Investigative microtechniques in medicine and biology, ed. J. CHAYEN, L. BITENSKY, **1**: 89-167, M. Dekker Inc. New York

ZIMMERMANN, U., J. VIENKEN, J. HALFMANN, C.C. EMEIS (1985): Electrofusion: A novel hybridization technique. Advances in Biotechn. Proc. **4**: 79-150

Meine akademischen Lehrer waren:

Baron, Brenner, Eisenmenger, Fluck, Haken, Hülser, Köhler, Kull, Kunze, Lesky, Mailänder, Mechelke, Mehrer, Möhn, Mundry, Neugebauer, Paus, Pick, Pilkuhn, Pfleiderer, Sauer, Schmid, Seybold, Stein, Wehrmaker, Weidlich, Weiß, Wolf.

Lebenslauf

Werner Mehrle
Villastraße 16
7402 Kirchentellinsfurt

Geboren am 10.7.1952	in Stuttgart
Eltern:	Alfred und Ella Mehrle wohnhaft in Hemmingen Krs. Ludwigsburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet seit 4.4.1986

Schul- und Hochschulausbildung:

1959 - 1974	Grund- und Realschule mit anschließender Berufsausbildung als Elektromechaniker Fachrichtung Elektronik. Gleichzeitig Weiterbildung an der Technischen Oberschule in Stuttgart mit Abschluß der fachgebundenen Hochschulreife.
Juli 1974 - Sept.1975	Wehrdienst bei der Bundeswehr,
Okt. 1975 - Mai 1982	Studium der Physik und Biologie für das Lehramt an Gymnasien an der Uni. Stuttgart,
1981 - 1982	mehrere Forschungsaufenthalte am Marine Laboratory der Hebrew University in Eilat,
Aug. 1982 - Jan.1984	Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Gymnasien am Seminar in Stuttgart,
Apr. 1984 - Dez.1984	Wiss. Angest. an der RWTH Aachen,
Jan. 1985 - Dez.1985	Wiss.Angest. an der Universität Würzburg,
seit 1.Jan.1986	Wiss. Angest. an der Universität Tübingen,
Dissertation :	seit April 1984 am Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. R. Hampp

Druck Köhler Tübingen